

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE

DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(Doctorat d'État)

PAR

Maurice PIERFITTE

Pharmacien

Chef de Travaux pratiques stagiaire

Ex-Interne des Hôpitaux

Lauréat de la Faculté et des Hôpitaux

Diplômé d'Études Supérieures de Chimie biologique

Diplômé d'Études Supérieures de Microbiologie

PREMIÈRE THÈSE

Contribution à l'étude de la résistance bactérienne
aux sulfamides. Comparaison de quelques métabolismes
chez Escherichia Coli sensible et résistant
à la sulfanilamide

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 7 Novembre 1959 devant la Commission d'Examen

Monsieur le Doyen KAYSER Président

Juges { Monsieur MARCHAL } Professeurs
 { Mademoiselle BESSON }

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Doctorat d'État)

PAR

Maurice PIERFITTE

Pharmacien

Chef de Travaux pratiques stagiaire

Ex-Interne des Hôpitaux

Lauréat de la Faculté et des Hôpitaux

Diplômé d'Études Supérieures de Chimie biologique

Diplômé d'Études Supérieures de Microbiologie

PREMIÈRE THÈSE

Contribution à l'étude de la résistance bactérienne
aux sulfamides. Comparaison de quelques métabolismes
chez *Escherichia Coli* sensible et résistant
à la sulfanilamide

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 7 Novembre 1959 devant la Commission d'Examen

Monsieur le Doyen KAYSER Président

Juges { Monsieur MARCHAL } Professeurs
 { Mademoiselle BESSON }

FACULTÉ DE PHARMACIE
UNIVERSITÉ DE NANCY

DOYEN

Professeur : F. KAYSER

ASSESEUR

Professeur : A. MEUNIER

SECRETAIRE

N°

PROFESSEURS

M. MEUNIER A.	Pharmacie gélénique
Melle FRANCOIS M. Th.	Matière médicale
MM. KAYSER F.	Chimie
FRANQUET R.	Botanique
MARCHAL J.G.	Microbiologie
STEIMETZ E.	Sciences Naturelles
BLOCH J.M.	Toxicologie
SOLEIL J.	Pharmacie chimique
BERNANOSE A.	Physique
Melle BESSON S.	Pharmacodynamie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M. BENE R.	Microbiologie
------------	---------------

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

M. MEUNIER A.	Hydrologie
Melle FRANCOIS M. Th.	Hygiène
MM. KAYSER F.	Biochimie technique
FRANQUET R.	Cryptogamie
MARCHAL J.G.	Parasitologie
STEIMETZ E.	Mycologie-Minéralogie
BLOCH J.M.	Chimie minérale
SOLEIL J.	Chimie organique
BERNANOSE A.	Optique et Acoustique
GRANGER (Professeur à la Faculté de Droit)	Déontologie
Melle BESSON S.	Techniques spéciales et méthodes modernes d'analyses.
MM. BENE R.	Bactériologie
ANZIANI P.	Caractères analytiques des sels
Mme LASSEUR A.	Techniques spéciales d'analyses bactériologiques
MM. MIRJOLET M.	Chimie analytique
PIERFITTE M.	C.E.S. Chimie biologique



CHEFS DE TRAVAUX

M. ANZIANI P.	Chimie
Mme LASSEUR A.	Microbiologie-Parasitologie
MM. MIRJOLET M.	Sciences pharmaceutiques
PIERFITTE M.	Chimie biologique
VILLOUTREIX J. (délégué)	Micrographie
PELT J.M. (délégué)	Chimie
Melle GIRARD Th. (déléguée)	Microbiologie

Doyen honoraire : M. RICHARD, Recteur de l'Académie de Montpellier.

Professeurs honoraires : M. CORDEBARD
M. DOURIS

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.

A MON MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Kayser
Doyen de la Faculté de Pharmacie

A MES JUGES

Monsieur le Professeur Marchal
Professeur de Microbiologie.

Mademoiselle Besson
Professeur de Pharmacodynamie.

A TOUS MES MAITRES

De la Faculté de Pharmacie de Nancy
et dans les hôpitaux

Hommage respectueux et reconnaissant

A MA FEMME ET A MES ENFANTS

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES AMIS

en témoignage de profonde affection.

AVANT-PROPOS

Avant d'exposer les résultats de mes recherches, il m'est agréable de consacrer à l'usage en remerciant ceux qui m'ont conduit à soutenir aujourd'hui cette Thèse.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Doyen F. Kayser qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a proposé le sujet de ce travail conciliant mes goûts pour la Chimie biologique et la Microbiologie. S'intéressant journellement à mes travaux, il m'a toujours témoigné la plus cordiale sollicitude ; je prie Monsieur le Doyen de bien vouloir accepter mes plus sincères remerciements et de croire à mon respectueux attachement.

Monsieur le Professeur J.G. Marchal a bien voulu accepter de juger mon travail ; je lui exprime ma profonde gratitude et je lui suis reconnaissant de son enseignement qui a suscité mon intérêt pour la Microbiologie.

Mademoiselle S. Besson, Professeur, m'a toujours manifesté son intérêt bienveillant et m'a apporté son aide en toute occasion dans l'accomplissement de ma tâche aux Travaux pratiques de Chimie biologique ; je suis heureux de lui exprimer mes remerciements sincères et ma profonde reconnaissance.

Je remercie tous mes Maîtres de la Faculté de Pharmacie de Nancy pour les précieux enseignements et les bienveillants encouragements qu'ils m'ont dispensés.

Mes remerciements vont également à tous mes camarades du laboratoire de Chimie pour la franche amitié qu'ils m'ont manifestée durant ces années de travail.

Le travail que nous présentons est une étude comparative d'une souche d'*Escherichia coli*, sensible à la sulfanilamide, et de souches dérivées, rendues résistantes à cette drogue ; il constitue une suite des travaux déjà effectués au laboratoire de Monsieur le Professeur Kayser (238-239-86-116-205), sur l'action des sulfamides associées ou non à divers corps, sur différents métabolismes de *E. coli*.

Le problème de la résistance aux drogues chez les microorganismes présente un grand intérêt tant biologique que médical. Il semble qu'une des premières observations de ce phénomène soit due à Kossiakoff (158) en 1887, à une époque où la Microbiologie était une science toute récente. La résistance aux antiseptiques, qu'il mettait en évidence lui permettait d'écrire que "la question des antiseptiques est une de celles qui intéresse le plus, et au meilleur titre, le public et les savants".

La mise en évidence de la résistance des bactéries à de nombreuses drogues, sulfamides, pénicilline, streptomycine et en général à toutes les

substances douées d'une remarquable action antimicrobienne découvertes ces dernières années, montre que ce phénomène reste une menace perpétuelle dans l'utilisation des agents antibactériens en clinique, ce qui a amené l'Organisation Mondiale de la Santé à proscrire l'usage abusif des antibiotiques en Médecine courante.

Si la biochimie de la résistance aux drogues est encore peu connue, ce n'est pas un symptôme de négligence de la part des chercheurs mais plutôt le signe de la complexité du problème qui a fait et fait encore l'objet de nombreuses recherches.

Dans le domaine qui nous intéresse, celui de la résistance aux sulfamides, ce problème semble un peu délaissé depuis l'apparition des antibiotiques mais nos connaissances sur le mode d'action des sulfamides sont encore bien incertaines.

L'étude de l'action d'une drogue sur un microorganisme peut se concevoir de deux façons différentes :

- soit que l'on étudie les perturbations du métabolisme, pris dans un sens très large, des microorganismes sensibles placés au contact de la drogue.

- soit que l'on recherche chez les microorganismes devenus résistants l'apparition de modifications qui pourraient expliquer le mode d'action de la drogue.

Notre travail porte essentiellement sur ce deuxième point.

Dans une introduction, nous passons rapidement en revue les différentes théories émises sur la résistance aux drogues en général, en consacrant un paragraphe particulier à la sulfamidorésistance. Nous exposons ensuite les techniques utilisées pour cultiver nos souches et mesurer leur croissance (chapitre I) et pour obtenir des souches résistantes (chapitre II).

Nous étudions et comparons la croissance des différentes souches dans nos conditions expérimentales (chapitre III) et nous avons tenté de mesurer la fixation de la sulfanilamide, en utilisant un produit radioactif (chapitre IV).

Nous étudions ensuite les modifications apparues dans le milieu de culture durant la croissance des différentes souches (chapitre V), puis les modifications apparues dans les bactéries elles-mêmes, du fait de leur résistance à la sulfanilamide (chapitre VI) : nous avons ainsi étudié les acides aminés des protéines, puis les acides nucléiques et nous avons tenté d'induire une sulfamidorésistance à l'aide d'acides nucléiques extraits d'une souche devenue résistante.

Abréviations et conventions utilisées dans le texte ou
dans l'expression des résultats.

SA = sulfanilamide (1162 F).

E.coli N = souche sensible à la sulfanilamide.

E.coli SA 5 = souche résistante à une concentration de 5 g/l de SA.

E.coli SA 10 = souche résistante à une concentration de 10 g/l de SA.

Milieu N = milieu synthétique glucose-sels.

Milieu SA 5 = milieu synthétique glucose-sels contenant 5 g/l de SA.

Milieu SA 10 = milieu synthétique glucose-sels contenant 10 g/l de SA.

ARN = acide ribonucléique.

ADN = acide désoxyribonucléique.

PAB = acide para-aminobenzoïque.

ATC = acide trichloracétique.

D.O = densité optique mesurée en tube de 18 mm de diamètre à une longueur d'onde de 610 m μ , exprimée en centièmes de D.O, après déduction de la valeur initiale.

RA = radioactivité.

PS = précision statistique.

c/mn = coups par minute.

INTRODUCTION

DEVELOPPEMENT DE LA RESISTANCE AUX DROGUES CHEZ LES MICROORGANISMES.

Le problème de la résistance aux drogues chez les microorganismes ayant suscité de nombreux travaux, nous nous limiterons dans cette introduction à quelques exemples, renvoyant le lecteur aux revues générales publiées par Work (323) Miller et Bohnoff (206) Gale et Davies (100) Schnitzer et Grunberg (259) et aux comptes rendus du Symposium de la Fondation Ciba (53).

A la suite de l'observation initiale de Kossiakoff (158), Ehrlich (85) en 1909 retrouva un phénomène analogue de résistance aux antiseptiques, à propos de l'action des colorants sur les trypanosomes ; depuis, de nombreuses expériences ont été réalisées montrant que les microorganismes peuvent acquérir spontanément ou progressivement la capacité de croître en présence de concentrations de plus en plus fortes d'une substance initialement toxique.

I - OBTENTION DE SOUCHES RESISTANTES.

La résistance peut être obtenue in vivo ou in vitro ; cependant la plupart des souches résistantes ont été obtenues in vitro et en 1932, soixante souches étaient répertoriées, ayant acquis leur résistance par la méthode générale des subcultures (259) : on ajoute au milieu de culture une quantité d'un produit donné, telle qu'elle ne supprime pas totalement la croissance ; le microorganisme récolté est repiqué sur des milieux renfermant des concentrations de plus en plus élevées de la substance inhibitrice, qui permettent encore sa croissance, traduisant ainsi l'acquisition d'un degré plus ou moins prononcé de résistance. Mais dans une espèce, et même entre différentes souches d'une espèce, la facilité de développement de la résistance peut varier d'une façon très large. Par cultures répétées en absence de drogue, la résistance peut se maintenir ou s'atténuer jusqu'à ramener le microorganisme à sa sensibilité initiale (Mc Intosh et Selbie, 182,). La nature de la drogue peut jouer un rôle dans la rapidité d'apparition de la résistance et, par exemple, les étapes sont plus rapides avec la streptomycine qu'avec la pénicilline.

D'autres méthodes que les subcultures ont été utilisées pour obtenir des microorganismes résistants ; Gezon et Collins (105) ajoutent la drogue durant la croissance bactérienne au lieu de l'incorporer au milieu de culture avant l'ensemencement, Novick et Szilard (223) réalisent des cultures continues dans un "chemostat" en présence d'une concentration constante de drogue. Roland et Stuart (249) obtiennent des *Salmonella typhi* résistants à la streptomycine, par addition au milieu de filtrats de cultures de *E. coli* streptomycinorésistants. Matsumoto (200) opère de même avec *Staphylococcus*

aureus et la pénicilline mais une technique analogue conduit Linz et Lecocq (173) à un échec. L'acide désoxyribonucléique, utilisé pour induire des transformations de type chez différentes espèces microbiennes a été employé par Hotchkiss (131) pour transférer à des pneumocoques sensibles la résistance à la pénicilline.

La méthode des subcultures in vitro est générale et permet d'obtenir finalement des microorganismes résistants. Il existe cependant des méthodes qui permettent de déceler ou d'obtenir une résistance après un seul passage, mais il semble qu'elles soient limitées à certaines drogues telles que la streptomycine (Demerec, 71,). Ceci nous amène à résumer les principales théories actuelles qui rendent compte de l'apparition de la résistance chez les microorganismes.

II - THEORIES PROPOSEES POUR EXPLIQUER L'APPARITION DE LA RESISTANCE AUX DROGUES.

Ce problème suscite de nombreuses discussions entre les partisans de deux théories.

a) Sélection de variants, spontanés ou non.

b) Adaptation progressive de l'ensemble d'une population bactérienne.

a) L'hypothèse de la sélection se prête à deux possibilités : ou la drogue sélectionne des organismes naturellement résistants qui seuls pourront se multiplier en présence de la drogue alors que les organismes sensibles seront inhibés, ou la drogue est mutagène et fait apparaître par mutation des organismes résistants qui seuls pourront proliférer en présence de la drogue.

L'existence d'organismes naturellement résistants, au sein d'une population bactérienne, a été mise en évidence par Luria et Delbruck (175) étudiant la résistance de *E. coli* au bactériophage. Ils proposèrent un test de fluctuation, qui consiste à ensemencer dans un milieu contenant une drogue, des inoculats venant d'une même culture issue d'une seule colonie, assez petits pour rendre improbable la présence de cellules résistantes. Si la résistance est due à une mutation qui se fait au hasard, on observera une fluctuation nette dans le nombre d'organismes résistants issus de chaque culture ; s'il y a simplement adaptation, il ne doit pas y avoir de différence importante entre les différents tubes de culture.

Ce test fut appliqué par Demerec (71) à l'étude de la résistance de *Staphylococcus aureus* à la pénicilline, par Oakberg et Luria (224) à la sulfamidorésistance de *Staphylococcus aureus* par Newcombe et Hawirko (221) à la streptomycinorésistance de *E. coli*. Cependant Ericksen (90-91) puis Dean et Hinshelwood (68) critiquèrent ce test car rien ne permet d'affirmer que les organismes résistants préexistaient dans la population et il est possible que ce soit la drogue elle-même qui ait provoqué quelques mutations.

Ces discussions amenèrent Lederberg et Lederberg (168) à proposer un nouveau test permettant de déceler la présence d'organismes résistants dans une population, sans que ces organismes viennent en contact avec la drogue.

Leur test de replication consiste à reporter sur une plaque de gélose contenant une drogue, l'empreinte des colonies ayant poussé sur une plaque de gélose sans drogue ; s'il existe des organismes naturellement résistants, ils donneront des colonies en présence de la drogue et il sera ainsi facile de prélever sur la plaque originale, les colonies correspondantes ; les au-

teurs sont ainsi parvenus à obtenir *Bact.coli* résistant à la streptomycine sans que le microorganisme ait été au contact de celle-ci ; Bryson et Szylbaski (41) par la même méthode, obtiennent une culture de *Bact.coli* résistante à l'isoniazide. Ces faits mettent ainsi en évidence la présence d'organismes spontanément résistants au sein d'une population bactérienne, à un taux que les auteurs s'accordent à reconnaître voisin de 1.10^{-6} .

b) L'hypothèse d'une adaptation progressive de tous les microorganismes d'une population est défendue principalement par Hinshelwood (126-127) ; l'adaptation correspondrait à une modification de la texture enzymatique de chaque cellule. Si une petite fraction de la teneur totale en enzymes est plus active que le reste de la cellule vis à vis d'un substrat donné, cette fraction va s'étendre et devenir prépondérante dans la cellule qui réajuste ainsi son équipement enzymatique pour lutter victorieusement contre le toxique. Cette modification se poursuit jusqu'à ce que la croissance reprenne sa valeur normale. Ainsi Baskett (13) montre qu'en ajoutant progressivement de la proflavine dans une culture de *Bact.lactis aerogenes* en pleine croissance, les cellules deviennent capables de tolérer des doses qui, initialement, se montraient inhibitrices. Or cette résistance est acquise dans un intervalle de temps trop court pour être imputable à une sélection de résistants spontanés et il faut bien admettre une adaptation de l'ensemble des bactéries. Suivant cette hypothèse, l'adaptation aux drogues deviendrait un cas particulier de l'adaptation enzymatique, la drogue jouant le rôle de substrat.

Sevag et Ishii (273) en accord avec Hinshelwood, pensent que la résistance aux sulfamides est liée à une altération de certains enzymes de toutes les cellules d'une population et rejettent la théorie de la mutation. Hinshelwood (128) critique la théorie de la mutation en posant le problème de la résistance acquise graduellement par paliers, ce qui nécessiterait d'envisager de nombreuses mutations ; de même, le retour d'un organisme résistant à la sensibilité initiale devrait s'effectuer par une nouvelle mutation ; or la mutation, caractérisée par la brusque apparition d'un caractère nouveau, est un phénomène exceptionnel.

Nous constatons donc que le problème de l'apparition de la résistance aux drogues chez les microorganismes est très complexe ; chaque théorie est défendue par ses partisans, s'appuyant sur des expériences nettes. Cependant pour Cavalli (45) étudiant la résistance avec *E.coli* K 12 qui présente une phase sexuelle, les résultats de croisements sont en faveur de l'hypothèse de mutations géniques déterminant une résistance totale ou graduelle, et il est prématuré de dire si l'adaptation non génétique peut jouer un rôle.

III - MISE EN EVIDENCE DE PROPRIETES NOUVELLES QUI POURRAIENT RENDRE COMPTE DE LA RESISTANCE DES MICROORGANISMES.

Indépendamment des processus qui font apparaître la résistance, on a cherché à mettre en évidence des propriétés physiques ou chimiques nouvelles que présenteraient les microorganismes résistants et qui permettraient de comprendre comment cette résistance est devenue possible.

1/ Modification de la perméabilité à l'agent toxique.

Certains spirochètes résistants à l'arsenic ou à l'or n'absorbent plus ces substances alors que les souches sensibles sont capables de les fixer ; c'est la théorie du "chemoceptor" d'Ehrlich où le processus de la résistance apparaît comme une perte de l'affinité entre une drogue et son récepteur spécifique. Rowley et coll (252) ont montré, en utilisant de la pénicilline marquée au soufre, que des souches de staphylocoques rendues pénicillino-résistantes, étaient incapables de fixer la pénicilline du milieu de culture alors que les souches sensibles retiennent une certaine quantité de pénicilline.

Cependant, pour Eagle (84), le développement de la résistance ne serait pas forcément associé à des changements de la capacité de fixation qui peut augmenter, diminuer ou rester inchangée.

2/ Destruction enzymatique ou modification de la drogue.

Pollock et Perret (235) ont montré que des souches de *Bacillus cereus* résistantes à la pénicilline synthétisent une quantité accrue de pénicillinase, capable de détruire la pénicilline ; mais il faut reconnaître que de nombreux microorganismes, sensibles à cette drogue ne possèdent pas de pénicillinase.

Kayser et Metzinger (148) émirent l'hypothèse que la sulfanilamide pouvait être transformée en acétylsulfanilamide inactive, par action du coenzyme A qui se trouve à un taux plus élevé chez *E. coli* sulfamidorésistant que chez la souche sensible dont il dérive.

3/ Elaboration d'une voie métabolique secondaire ("by pass") insensible à l'action de la drogue et permettant la synthèse ou l'utilisation d'un métabolite indispensable à la croissance.

Ainsi, Sevag et Green (269) ont montré qu'un staphylocoque entraîné à résister à la sulfamide en présence de glucose, n'est plus résistant si le glucose est remplacé par du pyruvate ; cela suggère que la sulfamide bloque une réaction de transformation du pyruvate en un métabolite essentiel et que les souches résistantes synthétisent ce métabolite par une autre voie.

4/ Production accrue de métabolites capables de neutraliser la drogue.

Dans certains cas la résistance peut s'expliquer par une synthèse accrue d'un métabolite qui vient inhiber l'action de la drogue. Ainsi Gerardin (103) montra que *Candida utilis* résistante au mercure a une teneur en groupements -SH 6 fois plus élevée que la souche sensible. Cette production accrue d'un métabolite peut devenir très importante et entraîner un phénomène de dépendance, par lequel un microorganisme devenu résistant à une drogue ne peut plus croître en absence de cette drogue ; ainsi Emerson (88) obtint un mutant de *Neurospora crassa* résistant à la sulfamide qui ne peut plus pousser en son absence et Zalokar (330) montra que cette sulfamide est nécessaire pour neutraliser la quantité excessive d'acide para-aminobenzoïque (PAB) synthétisé. Dans certains cas de sulfamidorésistance, on a pu mettre en évidence une synthèse accrue de PAB, ce que nous étudions dans le paragraphe suivant consacré au mode d'action des sulfamides.

Il semble donc que les microorganismes peuvent mettre en jeu des processus très variés pour résister à l'action d'un agent toxique, et il est fort probable que beaucoup d'entre eux échappent encore aux chercheurs ; si les discussions du Symposium de la Fondation Ciba sur la résistance aux drogues (1957) mettent en évidence tout le travail qui a déjà été accompli, elles montrent aussi tout celui qui reste à faire !

MODE D'ACTION DES SULFAMIDES ET SULFAMIDORESISTANCE

Les sulfamides ont une action bactériostatique plutôt que bactéricide, sauf pour de très fortes concentrations ou lorsque les conditions de culture sont défavorables. La sensibilité des différentes espèces est très variable et les sulfamides eux-mêmes exercent une inhibition plus ou moins forte sur une même souche bactérienne, selon leur structure. Bell et Roblin (19) étudiant l'influence de la structure chimique sur l'activité inhibitrice des sulfamides ont en effet montré que les substitutions sur le groupement aminé de la sulfanilamide renforcent son activité. Les chimistes ont donc cherché à obtenir

des molécules de sulfamides de plus en plus actives en réalisant des substitutions sur la sulfanilamide la plus simple, mais la structure de base en position para est nécessaire, les positions ortho et méta se révélant inactives.

La recherche du mode d'action des sulfamides a suscité de nombreux travaux, rassemblés par Henry (124). Diverses hypothèses ont été émises expliquant leur action par transformation en une forme active mais elles furent rapidement abandonnées quand Woods et Fildes (317), en 1940, montrèrent le pouvoir antagoniste de l'acide para-aminobenzoïque (PAB) vis à vis des sulfamides. Cette découverte confirmée par de très nombreux travaux, semblait expliquer le mode d'action des sulfamides : l'analogie de structure des deux corps faisait penser que la sulfamide entraînait en compétition avec PAB pour un système enzymatique nécessaire à la croissance bactérienne. Shive et Roberts (274) montrèrent que cet antagonisme compétitif s'établit à un taux voisin de 1 molécule de PAB pour 3 000 molécules de sulfanilamide, quelle que soit la concentration de la sulfanilamide dans le milieu de culture ; Rose et Fox (250) montrèrent que ce rapport varie suivant l'activité bactériostatique propre à chaque sulfamide et pensent que cette activité serait due à l'affinité de la molécule pour le récepteur habituel du PAB. Si le radical sulfonique d'une amine aromatique est remplacé par d'autres radicaux acides tels que AsO_3H_2 - PO_3H_2 - et que le produit soit bactériostatique, PAB est capable de l'antagoniser. Cependant le Marfanil ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{NH}_2$) dans lequel le groupement aminé NH_2 n'est pas fixé directement sur le noyau benzénique, est doué d'une activité bactériostatique mais n'entre plus en compétition avec le PAB (Hartles et Williams, 121,). D'autre part, des composés voisins de PAB tels que la procaine, l'acide paranitrobenzoïque, la para-aminobenzamide, la para-aminobenzaldéhyde, susceptibles d'être transformés en PAB dans l'organisme, montrent une action antagoniste vis à vis des sulfamides ; les acides ortho-aminobenzoïque et méta-aminobenzoïque ont des activités antagonistes beaucoup plus réduites vis à vis des sulfamides.

Ces différents travaux venant renforcer la théorie de Woods et Fildes, il devenait logique de penser que la sensibilité des différentes bactéries vis à vis des sulfamides pouvait être imputable à leur capacité de synthétiser un antisulfamide, en l'occurrence le PAB ; les souches résistantes aux sulfamides devraient alors posséder cette capacité à un degré élevé, l'anti-sulfamide pouvant même s'accumuler dans le milieu de culture. C'est ainsi que Mirick (207), utilisant des bactéries du sol spécifiquement adaptées à l'oxydation de PAB, put caractériser la présence de ce PAB dans des cultures de pneumocoques sulfamidorésistants. Landy et coll (164) mesurant le PAB contenu dans un filtrat d'une culture de *Staphylococcus aureus* sulfamidorésistant, montrèrent que le microorganisme produit une quantité élevée de PAB, en large excès de ce qui serait nécessaire pour inhiber l'action de la sulfamide. Ces auteurs notent cependant que des souches de *E. coli* sulfamidorésistantes ne produisent pas plus de PAB que les souches sensibles dont elles dérivent. Moss et Lemberg (214), Leskowitz et coll (172), opérant sur de grands volumes de cultures de *Staphylococcus aureus* sulfamidorésistant, réussirent à isoler, à purifier et à caractériser de façon certaine le PAB.

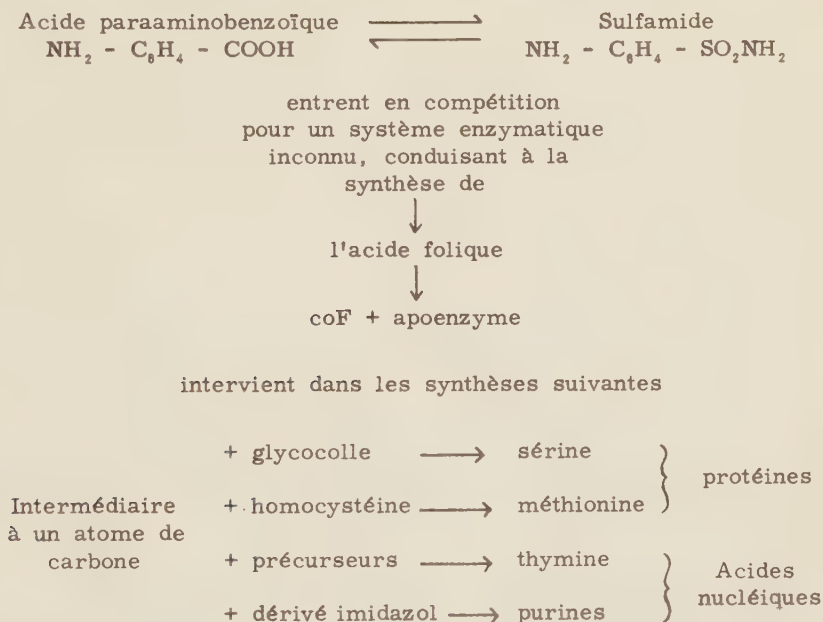
Dans certains cas de sulfamidorésistance, des pigments à structure dérivée du PAB, ont pu être caractérisés dans les milieux de culture (Spink et Vivino, 278, - Ishii et Sevag, 136, - Joshi et Sreenivasan, 141,).

Cependant cette augmentation de la synthèse de PAB n'a pu être mise en évidence pour tous les microorganismes devenus résistants, Sevag et Green (270) Yegian et coll (326) Lemberg et coll (170) ; il est d'ailleurs possible que le PAB, même s'il est synthétisé en plus grande quantité, ne soit pas libéré dans le milieu de culture et reste inaccessible à la mesure.

D'autres substances que le PAB sont douées d'une action antisulfamide , en particulier la méthionine peut atténuer l'action des sulfamides mais elle ne rend pas E.coli insensible (Harris et Kohn, 119,) ; le glycocolle, la sérine, la guanine et la xanthine, associées à la méthionine, renforcent son action (120) ; la thymine serait également douée de propriétés antisulfamides (Winkler et De Haan, 314,).

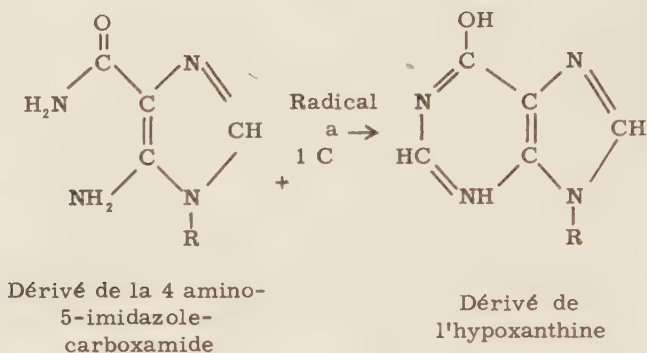
On a pu se demander comment il se fait que les sulfamides soient inhibées par des substances aussi différentes ; PAB étant la plus active d'entre elles, on a cherché à connaître son métabolisme dans la cellule bactérienne. Woods pense que PAB et sulfamide entrent en compétition pour un système enzymatique conduisant à la synthèse de l'acide folique ; Lampen et Jones (162) confirment cette hypothèse en montrant que l'inhibition par les sulfamides de la croissance de certains lactobacilles est levée de façon non compétitive, par l'acide ptéroylglutamique et pensent que l'action des sulfamides consiste à perturber la synthèse de l'acide folique par l'intermédiaire du PAB. Le système enzymatique, dans lequel intervient le PAB, n'a pas encore été isolé ; son coenzyme n'est ni l'acide folique ni l'acide folinique et Woods (318) appelle "coenzym form" (coF) ce dérivé de nature inconnue.

Shive (275), Woods (319) puis Woolley (320) ont rassemblé nos connaissances sur les rôles attribués à PAB et à l'acide folique dans les synthèses de différents métabolites chez les microorganismes et Hotchkiss et Evans (133) traduisent ces données par un schéma que nous reproduisons en l'adaptant.



Ainsi se trouverait expliquée l'action antisulfamide de la méthionine et de la thymine ; les sulfamides entrent également en compétition avec le PAB dans une suite de réactions qui conduisent à la synthèse des purines et des acides nucléiques ; ainsi Stetten et Fox (279) décelèrent une amine diazotable dans des cultures de E.coli partiellement inhibé par des sulfamides ; cette amine isolée et caractérisée, la 4 amino-5-imidazole carboxamide, serait un produit intermédiaire normal d'une réaction métabolique de la synthèse des purines, bloquée par les sulfamides.

Greenberg (110) a montré qu'elle existait sous forme de ribotide et de riboside, résultats confirmés par Gots (109). Cette amine a été également retrouvée dans des cultures de mutants de *E. coli* purines (-) par Gots (108) et dans des cultures de *E. coli* partiellement inhibées par l'aminoptérine analogue structural de l'acide ptéroylglutamique (Woolley et Pringle, 321.). Bergmann et coll (24), Ben Ishai et coll (22) montrèrent que la méthionine empêche l'accumulation de carboxamide mais que cette action n'est vraiment nette qu'en présence de traces de PAB ; ces auteurs pensent donc que la méthionine fournit le carbone qui permet la formation du noyau purique, selon le schéma :



Ils émettent l'hypothèse que la sulfamide se combine à ce radical à un seul atome de carbone et l'empêche ainsi de se fixer sur la carboxamide ; mais il n'y a pas de corrélation stricte entre l'inhibition de croissance et l'accumulation de carboxamide, ce qui prouve que la sulfamide peut avoir une autre action.

La vitamine B12 agirait comme la méthionine, en fournissant un radical $-\text{CH}_3$, mais ces deux corps ne seraient pas impliqués dans le métabolisme de l'amine (Alimchandani et Sveenivasan, 3.).

Williams et Buchanan (312) utilisant de la carboxamide marquée ont montré que ce produit entre effectivement dans la synthèse des purines chez les levures et Schulman et coll (261) ont confirmé que le produit se combine avec du ribose et un phosphate avant de pouvoir fixer un atome de carbone.

On connaît beaucoup moins le rôle joué par l'acide folique dans la synthèse de la thymine ; Webb et Nickerson (311) ont montré que l'acide folique est sans effet sur l'inhibition de la croissance de *E. coli* par des analogues structuraux tels que l'aminoptérine ; cependant la thymine lève cette inhibition ce qui semble indiquer qu'une réaction métabolique conduisant à la thymine a été bloquée.

Toutes ces études, découlant des travaux de Woods sur le rôle anti-sulfamide du PAB, semblent donc confirmer son importance dans le métabolisme bactérien et l'étude des différents produits doués d'une certaine activité antisulfamide montre que le PAB ou un dérivé à structure d'acide folique se trouve bien impliqué dans le mode d'action des sulfamides. Pourtant Sevag et Stewart (272) pensent que l'augmentation de carboxamide en présence de sulfamide serait due, en premier lieu, à l'action de la sulfamide sur le cycle citrique et l'inhibition de la synthèse des purines ne serait qu'un effet secondaire ; en effet l'aération d'une culture de *E. coli* empêche l'accumulation de carboxamide, ce qui indiquerait qu'elle est en rapport avec un passage à un métabolisme anaérobie et des produits tels que malonate, malate, succinate,

qui abolissent l'accumulation de carboxamide et antagonisent l'action des sulfamides, agiraient comme des métabolites dont la synthèse a été inhibée.

Sevag et Steers (271) pensent que les sulfamides interfèrent en premier lieu avec les enzymes respiratoires des bactéries. Kayser et Metzinger (148) formulèrent une hypothèse différente sur la sulfamidorésistance chez *E.coli*, pensant que la bactérie devenait capable d'inactiver la sulfanilamide en l'acétylant grâce au coenzyme A ; le dosage du coenzyme A dans la souche sensible et la souche résistante de *E.coli* montre que cette dernière en renferme environ 30 % de plus, ce qui pourrait rendre compte de la sulfamidorésistance. Cependant Joshi et Sreenivasan (140) montrèrent que l'acquisition de la sulfamidorésistance chez *Bacillus subtilis* ne s'accompagne pas de l'acétylation de la sulfanilamide.

Les modes d'action des sulfamides sont très variés et il est encore impossible de préciser quel est leur premier lieu d'attaque. Il serait nécessaire de pouvoir isoler les divers systèmes enzymatiques et d'étudier in vitro, l'action des sulfamides ; ce problème n'est pas encore résolu et laisse le champ libre à la recherche.

CHAPITRE I

GÉNÉRALITES :

SOUCHE UTILISÉE, TECHNIQUES DE CULTURE, MESURE DE LA CROISSANCE

I - MICROORGANISME UTILISÉ DANS NOS RECHERCHES.

De même que nos prédécesseurs (238-239-86-116-205) dans le Laboratoire de Chimie, nous avons utilisé une souche de *Escherichia coli*, bactérie ne prenant pas la coloration de Gram, facile à cultiver en milieu synthétique. La croissance s'effectuant de façon homogène, sans former de voile, se prête bien aux mesures opacimétriques.

Les caractères de cette souche d'origine urinaire étiquetée J3 dans la collection du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy (1), ont été définis dans la thèse de Pouteau-Thouvenot (239).

Au cours de notre travail, nous avons vérifié que cette souche avait gardé ses caractères biochimiques (2). Nous la conservons sur peptone gélosée à la température de + 4°C. Tous les trois mois, un isolement est réalisé sur plaque de gélose en boîte de Pétri : une colonie est ensuite prélevée avec une anse de platine, cultivée durant 24 heures en milieu liquide puis de nouveau ensemencée sur peptone gélosée ; après croissance à 37°C, la souche est replacée à la température de + 4°C.

II - MILIEU DE CULTURE EMPLOYÉ.

Nous avons utilisé un milieu synthétique glucose-sels, dérivé de celui de Tulasne et Wurtz (292) dans lequel l'urée, à cause de ses propriétés anti-sulfamides (151) est remplacée par du sulfate d'ammonium comme source d'azote.

La préparation de ce milieu a été standardisée de la façon suivante :

Pour obtenir un litre de milieu, dissoudre en chauffant légèrement 25 g de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 12 H_2O dans environ 500 ml d'eau distillée. Ajouter 100 ml d'une solution stock (ClK 5 g - PO_4KH , 10 g - SO_4Mg . 7 H_2O 5 g - $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 47,3 g - H_2O Q.S.p 1000 ml) et compléter à 800 ml avec de l'eau distillée. Stériliser durant 20 minutes à 120°C, laisser refroidir lentement ; filtrer pour éliminer le précipité cristallin qui s'est formé, précipité dont la persistance gênerait les mesures opacimétriques.

(1) Cette souche J3 a été mise à la disposition du Laboratoire de Chimie par Monsieur le Professeur J.G. Marchal que nous tenons à remercier.

(2) Ces résultats ont été confirmés, en fin de notre travail, par l'Institut Pasteur. Nous tenons à remercier Monsieur le Docteur P. Thibault qui a vérifié que nos souches avaient bien conservé leurs caractères d'espèce.

Ajouter la source carbonée, en général 10 g de glucose dans nos expériences, et compléter à 1000 ml avec de l'eau.

Le milieu est ensuite réparti dans des tubes à raison de 10 ml ou des ballons de différentes capacités, puis stérilisé 25 minutes à 105°C.

La composition de notre milieu est donc la suivante :

ClK	0,50 g
PO ₄ KH ₂	1 g
SO ₄ Mg. 7 H ₂ O	0,50 g
SO ₄ (NH ₄) ₂	4,73 g (correspondant à 1 g d'azote)
PO ₄ Na ₂ H. 12 H ₂ O	25 g
glucose	10 g
H ₂ O Q.S.p	1000 ml

Son pH, à la température ordinaire, est de 7,2.

Sa forte teneur en phosphates lui confère un pouvoir tampon important qui favorise la croissance microbienne, et d'autre part, l'addition de sulfanilamide à la concentration de 10 g/l ne modifie pas le pH initial.

III - METHODES DE CULTURE.

A - CULTURES NON AEREES.

Le milieu est réparti dans des tubes à essais calibrés de 18.180 mm à raison de 10 ml par tube, ou en fioles d'Erlenmeyer, ou en ballons.

Les tubes sont choisis dans un lot de tubes ordinaires après calibration du diamètre interne en vue de leur utilisation directe au spectrophotomètre. Leur fermeture est assurée par une capsule d'aluminium (34). Ce mode de fermeture présente de nombreux avantages sur le coton cardé : il n'est plus nécessaire de capuchonner les tubes avec du papier pour effectuer la stérilisation, l'évaporation est faible au cours de la conservation, la manipulation des tubes est facilitée durant les ensemencements, la capsule est utilisable pour porter les indications relatives aux cultures, enfin la même capsule peut servir indéfiniment. Nous avons vérifié que la stérilité du milieu se maintient dans les conditions habituelles de conservation.

B - CULTURES AEREES.

Lodge et Hinshelwood (174), Roberts (246) puis Dagley et coll (63) ont montré que la croissance bactérienne est augmentée par aération ; Chain et coll (47) ont étudié les conditions d'aération qui permettent une croissance abondante : il faut réaliser la plus grande surface possible de contact entre le milieu de culture et l'atmosphère ambiante.

Nous avons réalisé des cultures aérées par agitation mécanique ou par passage d'un courant d'air.

a) Par agitation mécanique.

Nous utilisons des fioles d'Erlenmeyer de 100 ml ; sur chacune d'elle est soudé un tube calibré 100.18 mm. Les fioles contenant 20 à 30 ml de milieu de culture sont placées dans un bain d'eau à 37°C et animées d'un mouvement latéral de va-et-vient d'une amplitude de 7 cm à la cadence de 60 allers-retours par minute.

La tubulure latérale permet de suivre la croissance bactérienne par

mesure de la densité optique, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer un prélèvement et cette mesure, qui est très rapide, ne perturbe pas la croissance.

b) Par passage d'un courant d'air.

Nous utilisons des ballons renfermant de 100 ml à plusieurs litres de milieu, fermés par un bouchon de caoutchouc traversé par deux tubes de verre ; ces tubes sont bouchés à leur extrémité externe par un tampon de coton retenu en place par un étranglement ; l'un des tubes est relié à une trompe à eau, l'autre à un barboteur à eau destiné à retenir les germes de l'air admis dans le milieu et à saturer cet air de vapeur d'eau pour éviter une concentration importante des milieux de culture dans les expériences de longue durée. Nous avons vérifié que ce dispositif n'amène pas de contamination de nos cultures. Les ballons sont placés dans une étuve ou dans un bain d'eau à 37°C.

IV - MESURE DE LA CROISSANCE.

Il existe de nombreuses techniques permettant de suivre la croissance bactérienne (Faguet, 92,).

- Numération de colonies après étalement sur gélose.
- Numération de germes dans une cellule compte-germes.
- Détermination du poids sec des bactéries récoltées.
- Dosage de l'azote total bactérien.
- Méthodes opacimétriques....

Chaque procédé présente des avantages et des inconvénients : les numérations en cellule peuvent amener des erreurs de 10 à 20 %, la technique d'étalement sur gélose ne dénombre que les microorganismes viables ; mais leur principal inconvénient réside dans le fait qu'elles nécessitent des prélèvements nombreux risquant de contaminer ou de perturber la culture durant son évolution. Aussi la plupart des auteurs utilisent des méthodes opacimétriques.

Dans nos recherches, nous avons donc exprimé la croissance par la densité optique. Nous avons cependant tenu à vérifier que les résultats obtenus étaient superposables à ceux que fournissent la pesée des bactéries sèches ou le dosage de l'azote total bactérien.

A - MESURE DE LA DENSITE OPTIQUE.

Nous utilisons le spectrophotomètre Coleman Junior ; les mesures sont effectuées sur les tubes même de culture, avec une lumière de longueur d'onde de 610 mμ. Soulignons qu'il faut prendre soin que la suspension bactérienne soit homogène, particulièrement durant la phase stationnaire.

Les mesures sont exprimées en densité optique multipliée par 100 pour faciliter l'expression des résultats ; d'autre part, nous retranchons systématiquement la densité optique du milieu de culture mesurée aussitôt après l'inoculation, de telle sorte que le nombre que nous rapportons, donne la mesure de la croissance bactérienne (densité optique nette que nous exprimons par les lettres D.O.).

La D.O n'est proportionnelle à la croissance bactérienne que dans certaines limites que nous avons précisées.

A partir d'une suspension épaisse de E.coli dans une solution de ClNa à 8,5 g/l, nous réalisons différentes dilutions suivant le tableau n° 1.

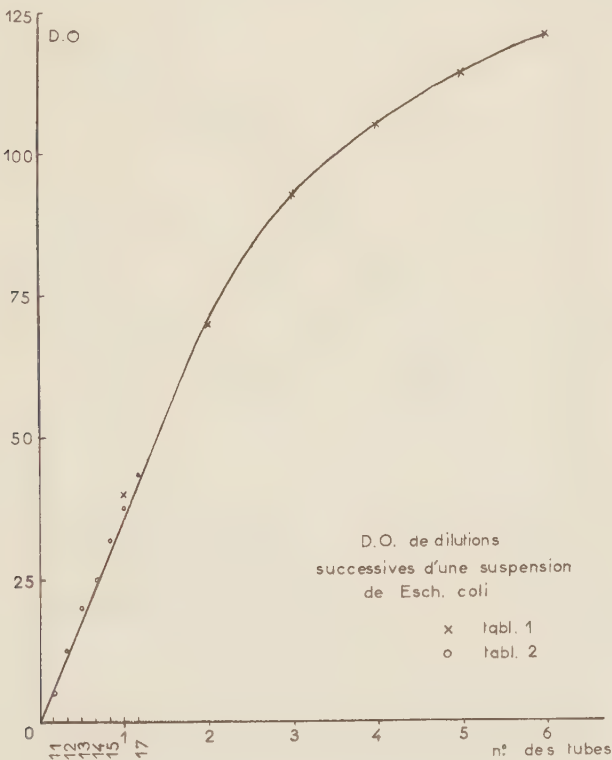
Tableau n° 1

Mesure de la D.O de dilutions d'une suspension
épaisse de *E. coli*

Tube n°	1	2	3	4	5	6
Suspension épaisse (en ml)	2	4	6	8	10	12
Solution ClNa (en ml)	10	8	6	4	2	0
D.O	40	70	93	105	114	121

Ces valeurs représentées sur le graphique n° 1 nous montrent qu'il n'y a plus proportionnalité entre la densité optique d'une suspension et sa teneur en bactéries quand la densité optique est supérieure à 70, résultats analogues à ceux de Lambin et Bernard (161).

Si, au contraire, nous partons d'une suspension initiale moins riche en germes, nous constatons que les densités optiques varient proportionnellement aux dilutions réalisées (voir tableau n° 2 et graphique n° 1).



Graphique 1 -

Tableau n° 2

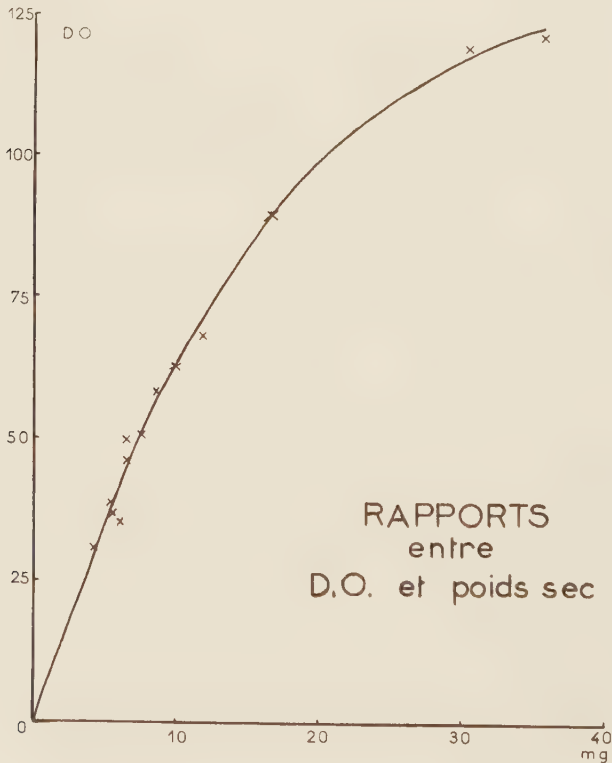
Mesure de la D.O de dilutions d'une suspension
peu épaisse de E.coli

Tube n°	11	12	13	14	15	16	17
Suspension peu épaisse (en ml)	1	2	3	4	5	6	7
Solution de ClNa (en ml)	9	8	7	6	5	4	3
D.O	6	13	20	25	32	38	44

B - DETERMINATION DU POIDS BACTERIEN.

Nous avons déterminé le poids sec de suspensions de E.coli lavés plusieurs fois à l'eau distillée pour éliminer totalement les substances provenant du milieu de culture ; nous mesurons les densités optiques de suspensions dont nous déterminons l'extract sec par évaporation de 10 ml dans un vase à tarer à 100°, jusqu'à poids constant.

Le tableau n° 3 rapporte les résultats obtenus.



Graphique 3 -

Tableau n° 3
Rapports entre D.O et extrait sec (de 10 ml)
d'une suspension de E.coli.

D.O	31,2	35,5	36	38	46,5	50	50,5	58,5	63,5	68,5	90	119	121
Poids sec (en mg)	4,38	6,14	5,60	5,50	6,52	6,50	7,60	8,75	10,00	11,91	16,70	31	36

Les résultats sont reportés sur le graphique n° 3. En choisissant les abscisses, la courbe représentative est rendue superposable à la courbe du graphique n° 1.

C - DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL BACTERIEN.

Les dosages sont effectués sur 10 ml de suspensions de E.coli lavés plusieurs fois à l'eau distillée. Après mesure de la densité optique, les suspensions sont minéralisées selon la méthode classique de Kjeldahl par l'acide sulfurique concentré en présence de catalyseur de Dumazert et Marcellet (80) (sélénite de mercure + sulfate acide de potassium).

L'azote est ensuite dosé par la méthode de Parnas-Wagner. Pour chaque série de dosages nous vérifions la bonne marche de l'appareil et l'état des réactifs par des dosages sur une solution étalon de chlorure d'ammonium.



Graphique 4 -

Le tableau n° 4 rassemble les résultats obtenus.

Tableau n° 4

Rapports entre D.O et azote total bactérien de 10 ml d'une suspension de E.coli.

D.O	23	44	52	60	75	77
Azote total (en μg)	450	900	1 215	1 350	1 800	2 000
D.O	83	85	91	96	121	
Azote total (en μg)	2 200	2 280	2 500	2 765	4 440	

Les résultats sont reportés sur le graphique n° 4.

Comme dans le cas de la détermination du poids sec bactérien, un choix correct des abscisses nous permet de tracer une courbe qui vient se superposer aux deux courbes précédentes.

En résumé, nous pouvons conclure que la mesure de la densité optique d'une suspension bactérienne homogène est parfaitement valable pour exprimer la croissance bactérienne, à condition qu'elle soit inférieure à une certaine valeur, 70 dans nos conditions expérimentales ; au-delà de cette valeur, il n'y a plus proportionnalité et il est d'ailleurs difficile d'assurer l'homogénéité de la suspension.

CHAPITRE II

OBTENTION DE SOUCHES DE E. COLI RÉSISTANTES A LA SULFANILAMIDE MAINTIEN DE LA RÉSISTANCE ACQUISE

L'adaptation de la souche de E.coli à la sulfanilamide (SA) a été réalisée par la méthode générale des subcultures, c'est-à-dire par passages successifs sur des milieux synthétiques à concentrations croissantes en sulfanilamide, ne renfermant aucune substance pouvant présenter une action anti-sulfamide, telle que peptones ou certains acides aminés (Tabonne et coll, 286,).

Nous avons tout d'abord testé la sensibilité de notre souche vis à vis de la sulfanilamide, dans nos conditions expérimentales. L'âge des bactéries et le volume relatif de l'inoculat étant deux facteurs essentiels dans les études de sensibilité aux drogues (Youmans, 328, - Melchior et Klotz 202,) nous nous sommes attaché à standardiser nos expériences pour effectuer des comparaisons valables : à 10 ml de milieu, nous ajoutons un inoculat standard (que nous écrirons In.sd) de 0,2 ml d'une culture âgée de 20 à 24 heures, préalablement ramenée à une D.O = 20. Les cultures sont effectuées à 37°C.

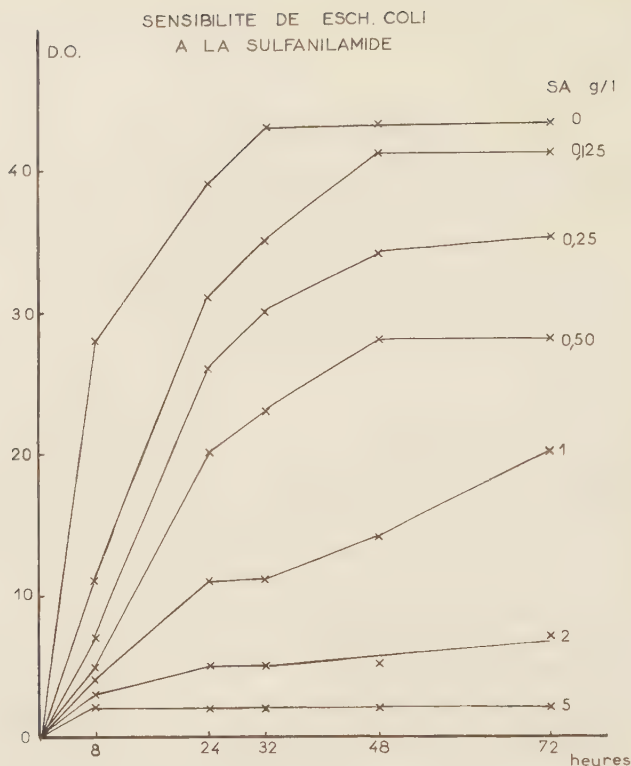
Dans ces conditions, nous avons obtenu les résultats qui figurent au tableau n° 5 et sont représentés par le graphique n° 5. Ils correspondent à la moyenne de plusieurs expériences.

Tableau n° 5

Etude de la sensibilité de E.coli à la
sulfanilamide (SA).

Concentration SA g/l	Temps en heures				
	8	24	32	48	72
0	28	39	43	43	43
0,125	11	31	35	41	41
0,250	7	26	30	34	35
0,500	5	20	23	28	28
1,000	4	11	11	14	20
2,000	3	5	5	5	7
5,000	2	2	2	2	2

Nous constatons une croissance, parfois très faible, dans tous les tubes ; en effet, même à la concentration de 5 g/l de sulfanilamide, une légère croissance se manifeste pendant les premières heures ; ceci peut s'expliquer par le fait que les bactéries renferment des métabolites de réserve qui leur permettent de se montrer insensibles à l'action de la sulfanilamide durant quelques générations ; après épuisement de ces réserves, la synthèse de ces



Graphique 5 -

métabolites étant inhibée par la drogue, la croissance devient de plus en plus faible jusqu'à s'annuler.

Après 32 heures, la croissance est terminée en absence de drogue ; *E. coli* est arrivé à la phase stationnaire. En présence de 0,50 g/l de sulfanilamide, nous pouvons constater que la culture atteint une D.O qui est sensiblement moitié de celle du témoin.

Au bout de 72 heures, la plupart des cultures sont en phase stationnaire, depuis un temps qui est d'autant plus long que la concentration en sulfanilamide est plus faible.

Nous constatons que les courbes de croissance présentent des pentes de plus en plus faibles quand la concentration en sulfanilamide augmente ; ceci traduit un temps de génération de plus en plus grand, *E. coli* ayant de plus en plus de difficultés à synthétiser les métabolites qui lui sont nécessaires.

Connaissant la sensibilité de notre souche, nous avons tenté d'obtenir une souche résistante en réalisant des subcultures dans les conditions suivantes :

Après six passages en milieu sulfamidé à 0,50 g/l, la D.O atteinte au bout de 14 heures de culture est égale à 20 ; cinq passages successifs en milieu sulfamidé à 1 g/l permettent d'obtenir une D.O de 20 en 15 heures. Nous effectuons alors des cultures en milieu sulfamidé à 5 g/l ; la croissance

lente au début, D.O de 20 en 72 heures, augmente progressivement pour atteindre une D.O de 20 en 24 heures après 30 passages. Au soixantième passage, nous obtenons une D.O de 32 après 16 heures de culture, soit une croissance semblable à celle de la souche sensible en milieu normal. Ce résultat atteint est maintenu par passage quotidien en milieu sulfamidé à 5 g/l.

L'adaptation a été poussée de la même façon jusqu'à la concentration de 10 g/l qui correspond à la saturation du milieu de culture à la température ordinaire (le milieu doit alors être conservé à 37°C pour éviter la cristallisation de la sulfanilamide). Cette résistance étant acquise, les souches sont entretenues par passages quotidiens en milieu sulfamidé ; nous avons ainsi réalisé plus de 2 000 passages successifs.

L'examen microscopique des souches met en évidence quelques variations morphologiques chez *E.coli* SA 10 : les bactéries sont allongées, parfois en longs filaments de 4 ou 5 unités ne présentant aucun cloisonnement ; ces formes anormales disparaissent après quelques cultures en milieu non sulfamidé. Ce phénomène est fréquent ainsi que le rappelle Marchal (188) qui a obtenu des formes identiques avec *E.coli* cultivé en présence de pénicilline (191).

Cette méthode des subcultures n'est pas à l'abri des critiques ; Marchal (187) souligne l'importance des cultures pures issues d'une plastide unique, particulièrement dans l'étude de la variabilité. Aussi avons nous cherché à déceler la présence de microorganismes naturellement résistants à la sulfanilamide dans les populations bactériennes que nous avons utilisées comme inoculat.

A cet effet, nous avons ensemencé, dans dix expériences successives, 10 tubes de milieu sulfamidé à 5 g/l avec un inoculat standard de 0,2 ml de culture de 24 heures de *E.coli* sensible. Dans aucun tube nous n'avons observé une croissance supérieure à une densité optique de 5 ; or nous avons ainsi réalisé 100 cultures faites chacune à partir d'un inoculat contenant environ $1,2 \cdot 10^8$ bactéries ; nous avons donc ensemencé au total $1,2 \cdot 10^{10}$ bactéries sensibles parmi lesquelles nous n'avons pu mettre en évidence la présence de bactéries résistantes d'emblée à une concentration de 5 g/l de sulfanilamide.

Des essais identiques réalisés par étalement de la souche sensible sur gélose sulfamidée à 5 g/l en boîte de Pétri nous ont conduits aux mêmes résultats, c'est-à-dire à l'absence de bactéries naturellement résistantes.

D'autre part, la souche sensible de *E.coli* testée selon la technique de Szybalski et Bryson (284) des gradients de concentration en sulfanilamide dans de la gélose en boîte de Pétri, n'a jamais révélé de colonies dans la zone correspondant aux fortes concentrations en sulfanilamide alors que dans les mêmes conditions, la souche de *E.coli* adaptée à la concentration de 5 g/l donne des colonies sur toute la longueur de l'étalement.

Ces quelques essais tendent à montrer l'absence de bactéries spontanément résistantes à la sulfanilamide dans l'ensemble d'une culture de *E.coli*, de même que l'absence de mutation brusque sous l'influence de la sulfanilamide. D'ailleurs le mode d'obtention de la souche résistante, par paliers successifs, est aussi en faveur de l'adaptation progressive, mais il est difficile de préciser si l'adaptation concerne toutes les bactéries d'une population ou seulement quelques unes.

La résistance acquise est très stable, ainsi que le montrent les expériences suivantes.

Les souches résistantes (1) *E.coli* SA 5 et *E.coli* SA 10 conservées sur peptone gélosée non sulfamidée, durant cinq mois à une température de +4°C, gardent leur résistance. En effet, nous réalisons depuis ces cultures, un inoculat en milieu non sulfamidé ; après 24 heures de croissance, les bactéries sont passées dans leurs milieux respectifs, *E.coli* SA 5 sur milieu sulfamidé à 5 g/l et *E.coli* SA 10 sur milieu sulfamidé à 10 g/l ; nous obtenons une croissance normale en 24 heures.

La même opération, réalisée à partir de colonies isolées sur plaque de gélose, nous donne des résultats identiques en partant d'une seule colonie.

La résistance à la sulfanilamide se conserve après de nombreuses cultures en milieu non sulfamidé ; ainsi la souche *E.coli* SA 5 a été cultivée 50 fois de suite durant 24 heures en milieu non sulfamidé et testée en milieu sulfamidé à 5 g/l à chaque passage ; la persistance de l'adaptation a été constamment retrouvée.

Nous avons voulu vérifier que la résistance acquise vis à vis de la sulfanilamide était valable pour les autres sulfamides ; en effet, quand un micro-organisme est devenu résistant à un sulfamide, il se trouve en général résistant aux autres. Ces faits ont été mis en évidence en particulier par Sesler et Schmidt (266) avec le pneumocoque. Mais la résistance vis à vis d'une drogue peut se manifester vis à vis d'autres produits, présentant ou non une analogie de structure, c'est ce que les auteurs dénomment la "résistance croisée". Gezon et Fasan (104), Szybalski et Bryson (284), Finland et Wilcow (94).

Cette résistance croisée peut parfois s'expliquer par une identité des mécanismes d'action des drogues, ainsi Lecocq et Linz (167) signalent une résistance simultanée de *Staphylococcus aureus* à la streptomycine et au chlorure mercurique et pensent pouvoir attribuer cette double résistance à un même mode d'action sur les groupements -SH des bactéries.

Nous avons utilisé :

La Fontamide	p-amino phényl sulfa thio-urée
La Thiazomide	p-amino phényl sulfamido thiazol
La Sumédine	p-amino phényl sulfonyl-amino 2 méthyl 4 diazine

à des concentrations de 0,125 - 0,250 - 0,500 - 1 g/l dans le milieu synthétique glucosé.

Le tableau n° 6 rassemble les résultats.

(1) Désormais nous utiliserons les abréviations suivantes :

E.coli N : la souche sensible.

E.coli SA 5 : la souche résistante à 5 g/l SA.

E.coli SA 10 : la souche résistante à 10 g/l SA.

Tableau n° 6

Croissance de *E.coli* N et SA 5 en présence de
différentes sulfamides.

Temps en heures.	Souches	Concentration en sulfamide en g/l			
		0,125	0,250	0,500	1
	<u>Fontamide</u>				
8	N	4	4	4	1
	SA 5	9	5	2	1
24	N	8	7	6	3
	SA 5	36	25	15	10
32	N	8	7	7	3
	SA 5	36	28	16	10
48	N	8	7	7	3
	SA 5	36	30	16	10
	<u>Thiazomide</u>				
8	N	5	4	3	2
	SA 5	4	4	2	1
24	N	6	5	5	3
	SA 5	22	19	10	5
32	N	6	5	5	3
	SA 5	24	19	13	8
48	N	6	5	5	3
	SA 5	32	27	15	8
	<u>Sumédine</u>				
8	N	4	4	4	3
	SA 5	5	4	4	3
24	N	6	6	6	5
	SA 5	27	13	7	5
32	N	7	7	6	5
	SA 5	27	19	10	6
48	N	8	8	7	5
	SA 5	27	21	11	6
	<u>Sulfanilamide</u>				
8	N	11	7	5	4
24	N	31	26	20	11
32	N	35	30	23	11
48	N	41	34	28	14

Nous retrouvons un résultat bien connu, la sulfanilamide possède une action bactériostatique plus faible que les autres sulfamides utilisées.

La résistance de notre souche *E.coli* SA 5 se retrouve vis à vis des autres sulfamides ; ainsi, la thiazomide à la concentration de 0,125 g/l inhibe la croissance de *E.coli* N (D.O = 8 en 48 heures) alors que *E.coli* SA 5 atteint une D.O de 36 dans le même temps.

En conclusion, nous avons obtenu par subcultures des souches de *E.coli* résistant à des concentrations de 5 et même 10 g/l de sulfanilamide. Il s'agit bien d'une adaptation progressive car nous n'avons jamais obtenu, aussi bien spontanément qu'au cours des nombreux passages effectués, de croissance inattendue qui pourrait être la marque d'une mutation brusque.

Cette résistance acquise est très stable et se maintient durant de nombreuses générations, même en l'absence de sulfanilamide.

CHAPITRE III

ÉTUDE DE LA CROISSANCE DE E. COLI SULFAMIDOSENSIBLE ET SULFAMIDORÉSISTANT

Pour comparer la souche de *E. coli* sensible à la sulfanilamide et les souches résistantes qui en dérivent, nous avons étudié en premier lieu leur croissance.

Les auteurs sont généralement d'accord pour distinguer un certain nombre de phases caractéristiques dans la croissance des cultures bactériennes ; ainsi Monod (212) rapporte l'existence de huit phases successives :

- I - Phase de croissance nulle.
 - II - Phase d'accélération du taux de croissance.
 - III - Phase de croissance à taux constant ou phase logarithmique ou phase exponentielle.
 - IV - Phase de diminution du taux de croissance.
 - V - Phase à taux de croissance nul : phase stationnaire.
 - VI - VII - VIII - Phases de décroissance à taux variables.
- } Phase de latence

La phase de latence, ou temps de latence, comprend la période qui s'étend entre l'inoculation et le moment où paraît s'établir le taux de croissance constant, caractéristique de la phase exponentielle.

Selon Monod, cette phase de latence est souvent difficile à interpréter et il semble qu'il soit nécessaire de considérer :

1) L'état physiologique des bactéries inoculées : lorsqu'elles sont prélevées durant la phase exponentielle, elles possèdent toute leur vitalité et peuvent pousser immédiatement sans présenter de latence ; par contre, si elles sont prélevées durant la phase stationnaire, elles risquent d'être altérées par intoxication ou par inanition et le temps de latence correspondrait à une période de restauration durant laquelle les conditions physiologiques optima sont à nouveau réalisées.

2) Dans le cas des milieux synthétiques, le temps de latence pourrait être attribué à la présence de faibles doses de substances toxiques, vraisemblablement des ions métalliques. La croissance ne pourrait s'établir à son taux maximum, qu'après neutralisation de ces toxiques.

D'autres facteurs doivent également être considérés : en particulier, Marchal et coll (190) mettent en évidence le rôle du facteur masse dans les phénomènes de multiplication ; c'est la théorie de l'allélocatalyse définie par Robertson : une cellule isolée croît et se développe moins vite que plusieurs cellules groupées dans un même milieu : il y aurait donc une véritable catalyse de la croissance de chaque cellule du fait de la présence d'autres cellules identiques. Le changement de milieu de culture entraîne également une certaine latence.

La phase de latence paraît donc liée à de nombreux facteurs et son existence est contestée, Kaplan-Brille (145). David (65), Neipp (218), Pham-Gia (232) montrent que les méthodes utilisées pour mettre en évidence la phase de latence sont entachées d'erreur : en particulier, le dénombrement des bactéries viables par repiquage sur milieu solide donne régulièrement des valeurs trop faibles et ces auteurs préconisent la numération directe ou la pesée des bactéries ; Faguet (92) étudiant la croissance bactérienne par enregistrement continu de la densité optique, ne constate pas de phase de latence en partant d'inoculats de $2,5.10^7$ à $2,5.10^8$ bactéries par ml.

Avant de comparer la croissance de nos différentes souches, il était nécessaire d'étudier en détail la multiplication de *E. coli* N particulièrement au début, à la phase dite de latence.

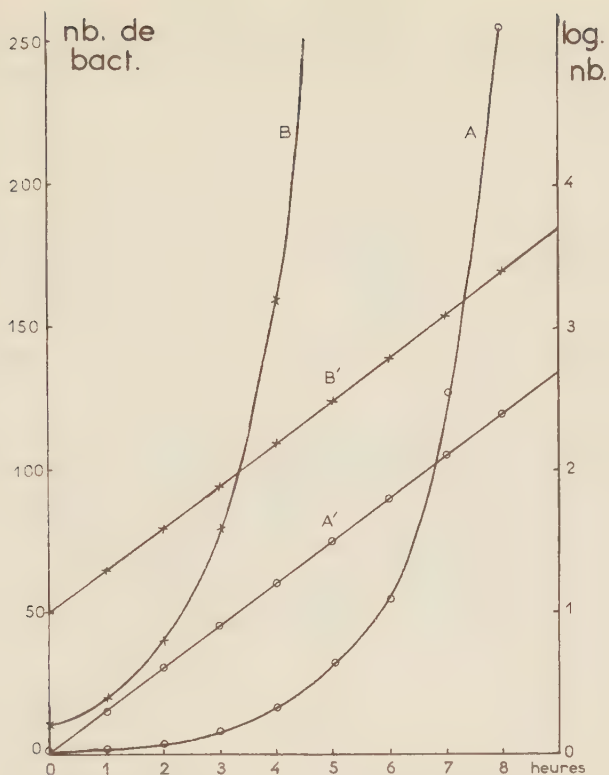
I - ETUDE DU DEBUT DE LA CROISSANCE DE E.COLI N.

Nous avons pu l'aborder grâce à l'emploi du néphélomètre Coleman, modèle 7, qui permet de mesurer la lumière diffusée par une suspension (effet Tyndall) ; l'intensité de la lumière diffusée est proportionnelle à la concentration des particules en suspension, à condition que celle-ci soit faible et que la source lumineuse soit très intense. Nous avons vérifié, sur des suspensions de *E. coli* à divers taux de dilution, que la lumière diffusée est proportionnelle au nombre de bactéries, entre les valeurs de 10^8 et 3.10^8 par ml ; au-delà de 300 millions, nous mesurons la densité optique des cultures.

L'utilisation du néphélomètre Coleman nécessite des précautions particulières ; l'appareil est si sensible qu'il faut tenir compte du pouvoir dispersif du milieu de culture, valeur qui est retranchée à chaque mesure pour obtenir un nombre correspondant uniquement aux bactéries en suspension dans le milieu. Les mesures sont effectuées dans des tubes calibrés spéciaux, fournis avec l'appareil. Le milieu de culture doit être parfaitement limpide et le bouchage au coton doit être remplacé par une fermeture avec une capsule d'aluminium pour éviter l'introduction, toujours à craindre, de filaments de coton qui fausseraient les mesures. De même, l'extérieur des tubes doit être parfaitement propre et le verre ne doit présenter aucune rayure qui perturberait les mesures. L'appareil est utilisé à la sensibilité maximum.

Les résultats des mesures sont exprimés en unités "néphélos". L'appareil est étalonné, à chaque série d'expériences, avec une gamme de tubes, constitués par des suspensions stabilisées dans une matière plastique ; 100 unités néphélos correspondent à l'intervalle de transmittance de 100 % à 98 %. L'appareil permet de mesurer des troubles atteignant 250 unités néphélos, ce qui correspond à une densité optique d'environ 10. Il est donc particulièrement adapté à la mesure du début de la croissance bactérienne, au moment où les mesures de la densité optique manquent de précision.

Avant d'exposer nos résultats, il nous semble utile de faire quelques remarques sur l'expression et la représentation graphique des mesures et sur la sensibilité des appareils utilisés : la représentation graphique d'une courbe de croissance en portant le temps en abscisse et la densité optique en ordonnée, se traduit par une courbe classique en S, courbe qui fait apparaître une phase dite de latence, une phase exponentielle, une phase de croissance réduite et une phase stationnaire. Mais si, maintenant les temps en abscisse, nous portons en ordonnée le logarithme du nombre qui exprime la D.O., ce qui correspond au logarithme du nombre de bactéries en suspension, la courbe en S se transforme en une droite.



Graphique 6 - Représentation graphique habituelle (A et B) et logarithmique (A' et B') d'une croissance théorique.

Le graphique n° 6 représente la croissance théorique d'une bactérie (courbe A et droite A') et de 10 bactéries (courbe B et droite B') dont le temps de génération serait de 1 heure. Nous voyons nettement que l'aspect aplati des courbes A et B est trompeur puisque, par hypothèse, la croissance est régulière, ce que les droites A' et B' montrent de façon nette. La lenteur avec laquelle la courbe amorce sa partie franchement ascendante dépend de l'importance de l'inoculat ainsi qu'il ressort de l'examen des courbes-A et B ; la vitesse de division étant la même, les droites A' et B' sont parallèles. Monod (212) conseille ce mode de représentation en utilisant des logarithmes de base 2, ce qui permet un calcul très facile du temps de génération. Cependant les logarithmes de base 10 sont plus familiers et permettent également le calcul graphique du temps qui sépare deux points de la droite dont les ordonnées diffèrent de 0,30 ($= \log 2$), ce qui correspond à une multiplication par 2 du nombre des bactéries, donc à une génération.

Si nous envisageons la sensibilité des appareils utilisés, nous constatons qu'elle est très faible pour le spectrophotomètre Coleman : en effet, la présence de 1 000 000 de bactéries dans 10 ml de milieu n'est pas mesurable et se traduit par D.O = 0. Dans nos conditions expérimentales habituelles, notre inoculat standard apporte environ 120 millions de bactéries pour 10 ml de milieu, ce qui est déjà visible à l'oeil mais n'est mesurable au spectrophotomètre qu'avec une grande imprécision. Par contre au néphélomètre Coleman, cet inoculat est nettement mesurable, ce qui nous a permis de suivre le début de la croissance de nos différentes souches.

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié la crois-

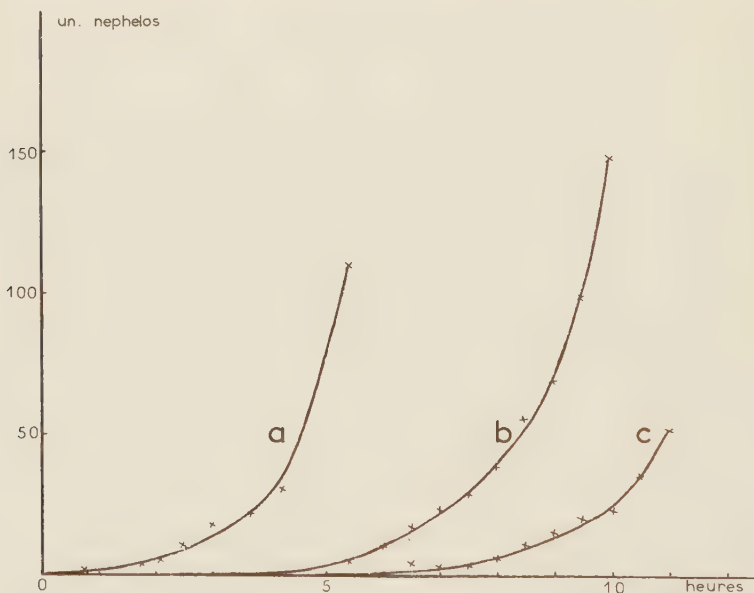
sance de *E.coli* N dans 10 ml de milieu, en réalisant des inoculats de plus en plus faibles.

- a) Inoculat standard.
- b) Inoculat standard dilué au dixième.
- c) Inoculat standard dilué au centième.

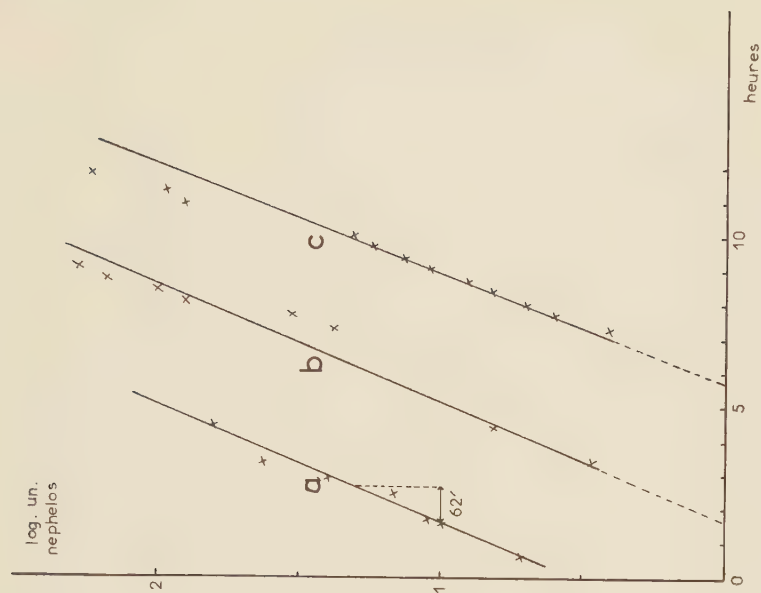
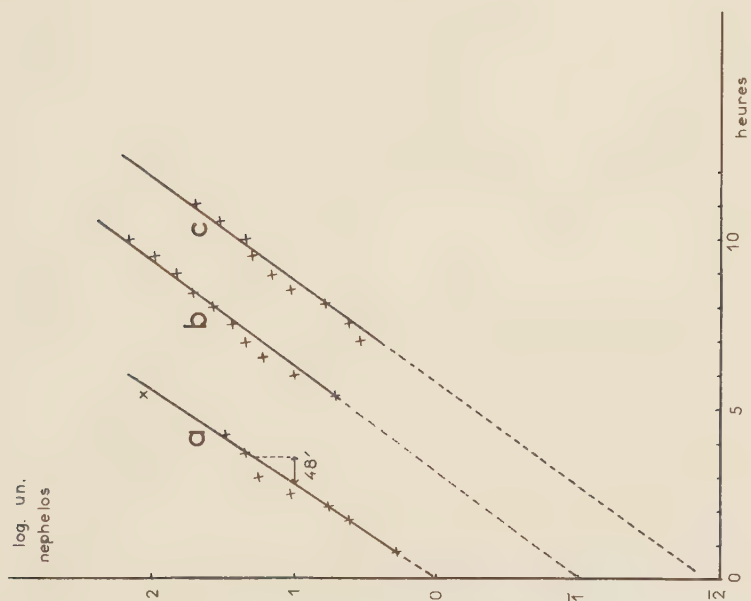
Les inoculats sont prélevés dans des cultures âgées de 13 heures. Les tubes sont amenés à 37°C avant d'être ensemencés et placés dans un bain d'eau à 37°C à proximité des appareils de mesure, selon les recommandations de Toennies et Gallant (290).

Les tableaux n° 7 - 8 - 9 - 10 et les graphiques n° 7 - 7 bis - 8 - 9 - 10 rendent compte des résultats.

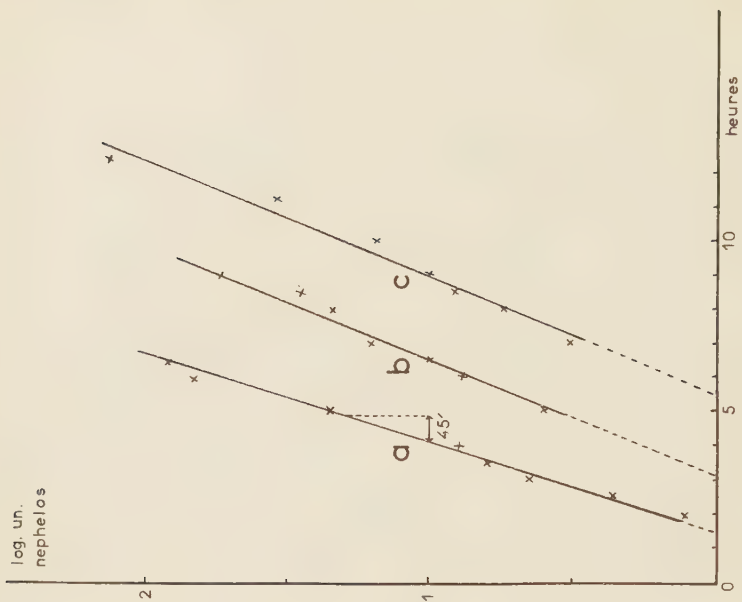
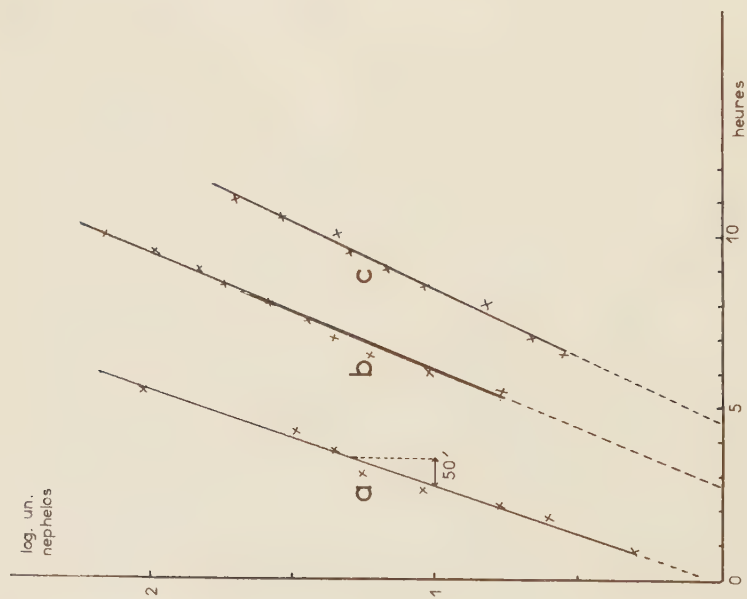
Dans le graphique n°7 bis nous avons représenté la croissance en portant en ordonnée les unités "néphélos". En comparant les graphiques n° 7 et n° 7 bis qui traduisent la même expérience, nous constatons que la représentation habituelle peut prêter à confusion : en effet, la représentation logarithmique (graphiques n° 7 - 8 - 9 - 10) nous montre que la croissance est régulière, les points représentatifs étant sensiblement alignés ; au contraire le graphique n° 7 bis suggère une phase de latence d'autant plus allongée que l'inoculat est plus faible, alors qu'en réalité la croissance s'établit au même taux dans les trois tubes.



Graphique 7 bis - Représentation habituelle de la croissance de *E.coli* N mesurée par néphélométrie.



Graphiques 7 et 8 - Représentation logarithmique de la croissance de *E. coli* N en milieu non sulfamidé. Mesures néphélométriques.



Graphiques 9 et 10 - Représentation logarithmique de la croissance de *E. coli* N en milieu non sulfamidé. Mesures néphélométriques.

Tableau n° 7

Etude néphélométrique de la croissance de *E. coli* N en milieu non sulfamidé.

Expérience n° 1

Temps en heures et minutes	Tube a (In. sd)		Tube b (1/10 In. sd)		Tube c (1/100 In. sd)	
0.30	2	0,30				
1.45	4	0,60				
2.05	6	0,77				
2.30	11	1,04				
3	18	1,25				
3.40	22,3	1,35				
4.15	31	1,49				
5.25	109	2,03	5,3	0,72		
6			10,6	1,02		
6.30			17,3	1,23		
7			23,3	1,36	3,6	0,55
7.30			28,6	1,45	4,3	0,63
8			38	1,58	6,6	0,82
8.30			55	1,74	11,1	1,04
9			68	1,83	15	1,17
9.30			98	1,99	20	1,30
10			147	2,16	22,5	1,35
10.30					35	1,54
11					51	1,70

Dans chaque colonne, le premier nombre exprime la croissance en unités néphélos, le second en logarithmes des unités néphélos.

Tableau n° 8

Etude néphélométrique de la croissance de *E. coli* N en milieu non sulfamidé.

Expérience n° 2

Temps en heures et minutes	Tube a (In. sd)		Tube b (1/10 In. sd)		Tube c (1/100 In. sd)	
0.35	5,3	0,72				
1.40	11,2	1,05				
2.20	15	1,17				
2.50	25	1,40				
3.20	43	1,63	3	0,47		
4.25	63	1,80	6,6	0,82		
7.15			24	1,38	2,6	0,41
7.40			34,3	1,53	4	0,60
8			81	1,90	5	0,70
8.20			99	2,00	6,6	0,82
8.40			156	2,18	8,3	0,91
9			193	2,28	11	1,04
9.20					13,6	1,13
9.40					16,6	1,14
10					20,6	1,31
10.50					80	1,90
11.15					95	1,97
11.45					171	2,23

Dans chaque colonne, le premier nombre exprime la croissance en unités néphélos, le second en logarithme des unités néphélos.

Tableau n° 9

Etude néphélométrique de la croissance de *E. coli* N en milieu non sulfamidé

Expérience n° 3

Temps en heures et minutes	Tube a (ln. sd)		Tube b (1/10 ln. sd)		Tube c (1/100 ln. sd)	
0.45	2	0,30				
1.45	4	0,60				
2.05	6	0,77				
2.30	11	1,04				
3.00	18	1,25				
3.40	22,3	1,35				
4.15	31	1,49				
5.25	109	2,03	6	0,77		
6.00			10,6	1,02		
6.30			17,3	1,23	3,6	0,55
7.00			23,3	1,36	4,6	0,66
7.30			28,6	1,45	-	-
8			38	1,58	6,6	0,82
8.30			55	1,74	11,1	1,04
9			68	1,83	15	1,17
9.30			98	1,99	20	1,30
10			147	2,16	22,6	1,35
10.30					35	1,54
11					51	1,70

Dans chaque colonne, le premier nombre exprime la croissance en unités néphélos, le second en logarithme des unités néphélos.

Tableau n° 10

Etude néphélométrique de la croissance de *E. coli* N en milieu non sulfamidé

Expérience n° 4

Temps en heures et minutes	Tube a (ln. sd)		Tube b (1/10 ln. sd)		Tube c (1/100 ln. sd)	
2	1,3	0,11				
2.30	2,3	0,36				
3	4,6	0,66				
3.30	6,3	0,80				
4	8	0,90				
5	23	1,36	4	0,60		
6	69	1,83	7,6	0,88		
6.30	87	1,93	10	1,00		
7			16,3	1,21	3,3	0,51
8			22,6	1,35	5,6	0,74
8.30			29	1,46	8,3	0,91
9			56	1,74	10	1,00
10					15,6	1,19
11.15					35	1,54
12.30					135	2,13

Dans chaque colonne, le premier nombre exprime la croissance en unités néphélos, le second en logarithme des unités néphélos.

La représentation semi-logarithmique montre que la croissance débute dès l'inoculation et s'établit à un taux immédiatement constant. En effet, dans le graphique n° 7, le tube a correspond, au temps zéro, à une unité néphélos ($\log = 0$) ; le tube b, inoculé avec 10 fois moins de bactéries, devrait correspondre à 0,1 unité néphélos ($\log = \bar{1}$), valeur non mesurable, mais en prolongeant la droite b on retrouve sensiblement cette valeur ; le tube c, inoculé avec 100 fois moins de bactéries correspondrait à l'ordonnée $\bar{2}$ à l'origine. Le graphique n° 7 montre que nous observons bien ces faits, compte tenu des erreurs expérimentales.

Des conclusions analogues peuvent être tirées des graphiques n° 8 - 9 - 10.

Nous pensons donc que la croissance s'établit à un taux régulier et constant dès l'inoculation ; il faut noter que notre souche *E.coli* N est parfaitement adaptée au milieu de culture utilisé, sur lequel elle est entretenue par passages quotidiens depuis de nombreuses années.

Ces différents graphiques nous permettent également de calculer le temps moyen de division de *E.coli* N en milieu non sulfamidé.

En nous reportant au graphique n° 7, courbe a, nous constatons que pour passer de l'ordonnée 1 à 1,30 (soit une différence des logarithmes égale à 0,30, donc à une division bactérienne) il s'écoule un intervalle de temps de 48 minutes, qui est le temps moyen de génération de *E.coli* N durant cette expérience.

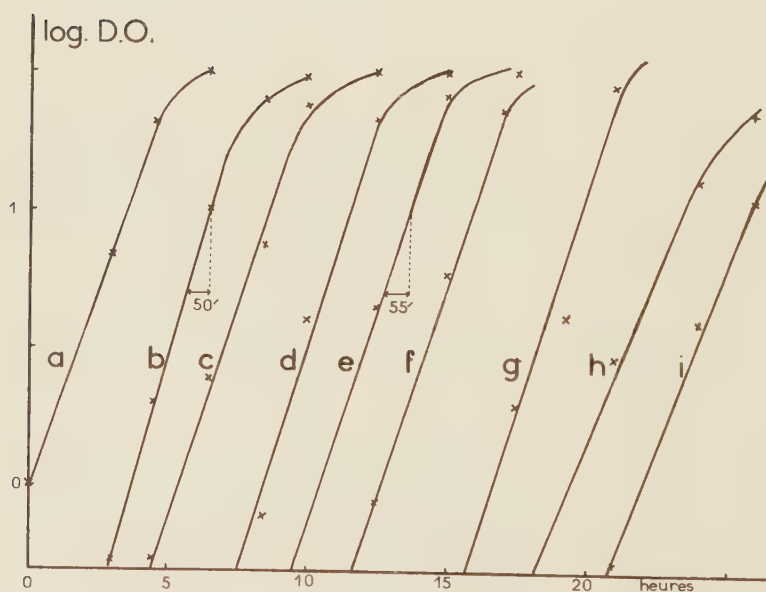
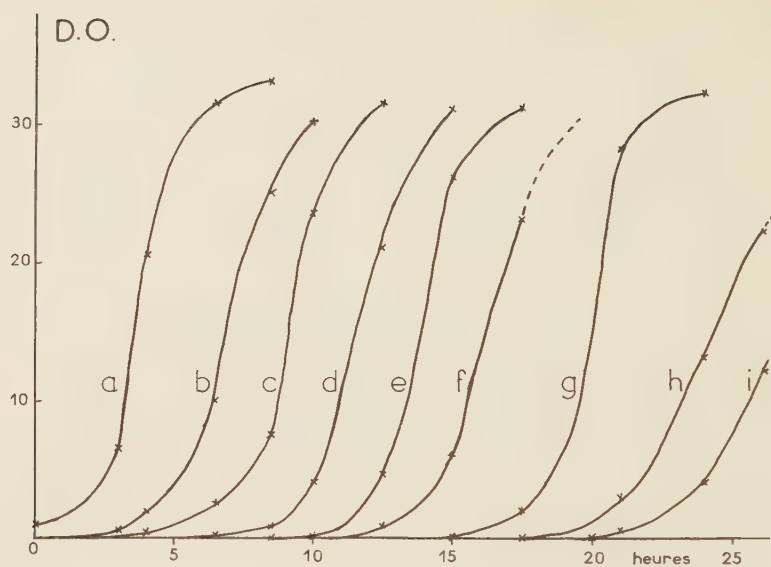
Le même calcul effectué sur les autres graphiques nous donne les valeurs : 62,5 - 50 - 45 minutes dont les différences sont probablement attribuables à de nombreux facteurs (état physiologique de l'inoculat - perturbations apportées durant la croissance par la nécessité de nombreuses mesures, impuretés possibles dans le milieu de culture...).

Ainsi, pour un inoculat d'environ 12.10^8 bactéries (tubes a) nous n'observons pas de latence, comme Faguet l'avait indiqué pour les gros inoculats. Nous avons voulu voir, si pour de faibles inoculats, il y a latence, comme on l'a souvent dit ; on peut se demander en effet, si la soi-disant latence ne correspond pas à une croissance invisible à l'oeil ou au spectrophotomètre. Pour cela nous suivons au spectrophotomètre la croissance de cultures réalisées en tubes, sur 10 ml de milieu, inoculées selon le protocole suivant :

Tube a :	inoculat standard de 0,2 ml.		
Tube b :	inoculat 10 fois plus faible que a.		
Tube c :	100	"	"
Tube d :	1 000	"	"
Tube e :	10 000	"	"
Tube f :	100 000	"	"
Tube g :	1 000 000	"	"
Tube h :	10 000 000	"	"
Tube i :	100 000 000	"	"

Une numération sur plaque de gélose à partir de 1 ml des tubes f et g nous donne respectivement 300 et 31 colonies (moyenne de deux plaques), c'est-à-dire que les inoculats réalisés dans les tubes h et i renferment très peu de bactéries.

La croissance mesurée par la densité optique, donne les valeurs qui figurent au tableau n° 11 représenté par les graphiques n° 11 et 11 bis.



Graphiques 11 et 11 bis - Croissance de *E. coli* N en milieu non sulfamidé, depuis des inoculats dilués successivement au dixième.
 n° 11 - représentation habituelle - n° 11 bis - représentation logarithmique.

Tableau n° 11

Etude de la croissance de *E. coli* à partir d'inoculats de plus en plus faibles.

La première valeur exprime la D.O, la deuxième valeur exprime log D.O.

Temps en heures	a	b	c	d	e	f	g	h	i
3	6,5 0,81	0,5 1,74	0						
4	20,5 1,31	2 0,30	0,5 1,74	0					
6.30	31,5 1,49	10 1,00	2,5 0,39	0,3 1,47					
8.30	33 1,51	25 1,39	7,5 0,87	0,8 1,90					
10		30 1,47	23,5 1,37	4 0,60	0	0			
12.30			31,5 1,49	21 1,32	4,5 0,65	0,9 1,95			
15				31 1,49	26 1,41	6 0,77	0		
17.30					31 1,49	23 1,36	2 0,30	0	0
21							28 1,45	3 0,47	0,5 1,74
24							32 1,50	13 1,11	4 0,60
26								22 1,34	11 1,04
30								32 1,50	25 1,39
34									32 1,50

Les droites semi-logarithmiques (graphique 11 bis) étant sensiblement parallèles, le temps de génération est du même ordre dans tous les tubes et voisin de 50 minutes. Cependant la lecture du graphique 11 laisserait croire que pour le tube f, par exemple, la latence a été de 10 heures.

Nous pensons qu'il n'en est rien et que pendant ces dix heures, les bactéries se sont multipliées régulièrement ; en effet, le tube f estensemencé avec 3 000 bactéries environ ; au bout de 50 minutes, ce nombre est de 6 000 puis il atteint 12 000 en 100 minutes et un calcul élémentaire montre qu'après 15 générations soit 12 h 30 le nombre des bactéries sera de 98 304 000, environ 10^8 , ce qui correspond à la limite inférieure de sensibilité du spectrophotomètre ; la simple mesure de la D.O laisserait donc croire à une phase de latence alors que la croissance a été continue.

Un calcul identique effectué avec les tubes d et h nous montre que la valeur 10^8 est atteinte après 7 h et 18 h respectivement, temps qui sont retrouvés sur le graphique n° 11.

Ceci nous prouve que la croissance débute dès l'inoculation et que son taux est régulier, sans phase de latence ; l'aspect des courbes est donc trompeur et la représentation semi-logarithmique rend mieux compte de la croissance bactérienne.

Par la suite nous avons pu enregistrer la croissance de nos cultures de façon continue grâce au biophotomètre de Bonét-Maury (Jouan, Constructeur

à Paris) et nous avons retrouvé les mêmes résultats. Cependant les courbes fournies par l'appareil doivent être transformées pour être comparables aux courbes que nous obtenons habituellement, le biophotomètre mesurant la transmittance de la culture.

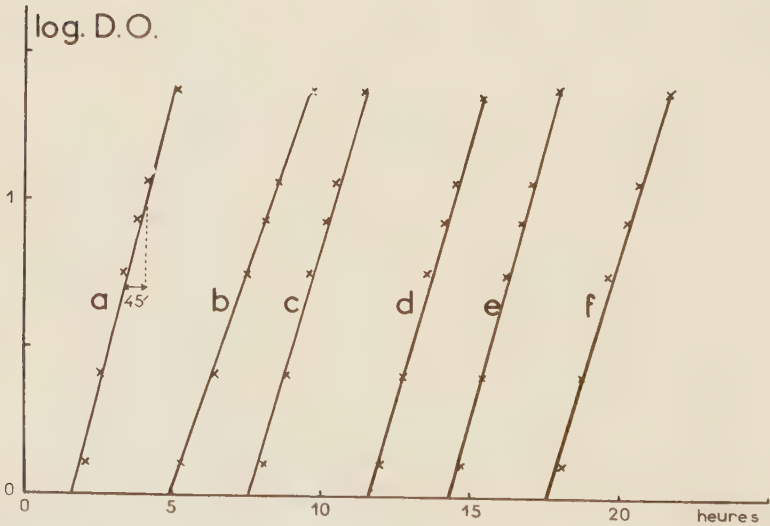
Nous avons dû établir une correspondance entre les données du biophotomètre en transmittance et les densités optiques mesurées au spectrophotomètre, les épaisseurs des suspensions bactériennes étant de 26 et 16 mm respectivement. Nous avons réalisé des suspensions dont les densités optiques échelonnées de 1 à 23 sont mesurées au biophotomètre avec des valeurs de transmittance de 78 à 6 %. Les résultats sont groupés dans un tableau d'équivalence.

Tableau d'équivalence entre densité optique et transmittance
des cultures bactériennes.

La densité optique est mesurée au spectrophotomètre Coleman Junior en tube calibré de 16 mm de traversée.

La transmittance est mesurée au biophotomètre Bonét-Maury en cuve de 26 mm de traversée.

Densité optique	log. de D.O	Pourcentage de transmittance
1,3	0,11	78
2,6	0,41	63
5,5	0,75	40
8,5	0,93	26
11,5	1,06	18
23,5	1,37	6



Graphique 12 - Croissance de E.coli N en milieu non sulfamidé, depuis des inoculats dilués successivement au dixième. Mesures au biophotomètre.

Grâce à cette transformation nous pouvons montrer que la croissance s'établit à un taux constant dès l'inoculation, ainsi que le montrent le tableau n° 12 et le graphique n° 12, les tubes a,b,c,d,e,f, correspondant à 10 ml de milieuensemencés selon le protocole indiqué page 37.

Nous constatons sur le graphique n° 12 que les points sont situés sur des droites, ce qui indique une croissance bien régulière ; la pente de ces droites nous montre que les bactéries de ces six inoculats, qui sont dans des rapports successifs de 1/10, ont commencé leur croissance dès l'inoculation, sans phase de latence. Le temps de génération de 45 minutes est voisin de celui trouvé avec le spectrophotomètre.

Tableau n° 12

Etude de la croissance de E.coli N à partir d'inoculats de plus en plus faibles.

Transmittance mesurée au biophotomètre	log. D.O calculé d'après le tableau p. 40	Temps en heures et minutes, au bout duquel est atteinte la valeur indiquée dans la première colonne					
		a	b	c	d	e	f
78	0,11	2.02	5.17	8.05	12.00	14.43	18.05
63	0,41	2.35	6.25	8.50	12.48	15.25	18.45
40	0,75	3.17	7.30	9.37	13.32	16.12	19.37
26	0,93	3.47	8.07	10.07	14.07	16.45	20.15
18	1,06	4.10	8.35	10.30	14.30	17.05	20.35
6	1,37	5.07	9.47	11.25	15.25	18.00	21.40

II - ETUDE DU DEBUT DE LA CROISSANCE DE E.COLI SA 5 EN MILIEU SULFAMIDE A 5 g/l.

Dans les mêmes conditions qu'avec E.coli N nous avons réalisé des inoculats de plus en plus faibles d'une culture de E.coli SA 5 en milieu sulfamidé à 5 g/l et nous avons suivi la croissance par néphélométrie.

Le protocole est identique à celui utilisé pour E.coli N et nous donnons simplement nos résultats dans le tableau n° 13 et le graphique n° 13.

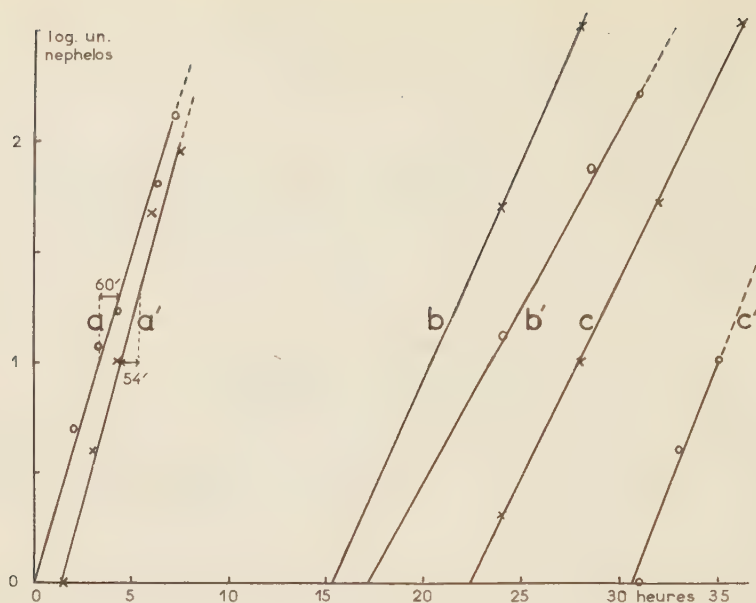
Tableau n° 13

Etude néphélométrique de la croissance de E.coli SA 5 en milieu sulfamidé à 5 g/l.

1ère expérience 2ème expérience

Temps en heures et minutes	Tube a (In. sd)	Tube b (1/10 In. sd)	Tube c (1/100 In. sd)	Temps en heures et minutes	Tube a (In. sd)	Tube b (1/10 In. sd)	Tube c (1/100 In. sd)
1.30	1 0			2	5 0,70		
3	4 0,60			3.15	12 1,08		
4.15	10 1,00			4.15	17 1,23		
6	47 1,67			6.15	63 1,80		
7.30	90 1,95	0 -	0 -	7.15	135 2,13	0 -	
24	illisible	50 1,70	2 0,30	24	illisible	13 1,11	
28		350 2,52	10 1,00	28.30		73 1,86	
32		illisible	53 1,72	31		163 2,21	1 0
36			330 2,52	33		illisible	4 0,60
			illisible	35			10 1,00

Dans chaque colonne, le premier nombre exprime la croissance en unités néphélos, le second en log. des unités néphélos.



Graphique 13 - Représentation logarithmique de la croissance de *E. coli* SA 5 en milieu sulfamidé à 5 g/l. Mesures néphélométriques.
a b c : exp. n° 1 - a' b' c' : exp. n° 2.

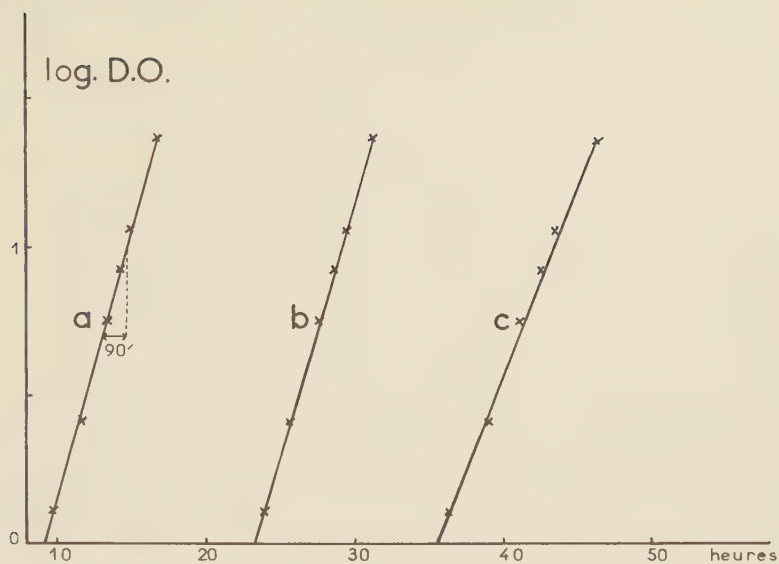
Nous constatons que la croissance est régulière même à partir d'inoculats faibles. Les temps moyens de génération, calculés d'après ces courbes, s'établissant à 54 et 66 minutes, à peine supérieurs à celui de *E. coli* N, montrant que l'adaptation est excellente.

Reprenant ces expériences avec le biophotomètre, nous avons obtenu des résultats analogues, rapportés dans les tableaux n° 14 et 15 et les graphiques n° 14 et 15.

Tableau n° 14

Etude de la croissance de *E. coli* SA 5 en milieu sulfamidé à 5 g/l à partir de faibles inoculats.

Transmittance mesurée au biophotomètre	log. D.O calculé d'après le tableau p. 40	Temps en heures et minutes, au bout duquel est atteinte la valeur indiquée dans la première colonne.		
		Tube a	Tube b	Tube c
78	0,11	9.45	24	36.30
63	0,41	11.45	25.50	39.10
40	0,75	13.30	27.45	41.25
26	0,93	14.25	28.45	42.40
18	1,06	15	29.30	43.35
6	1,37	16.45	31.20	46.30



Graphiques 14 et 15 - Croissance de *E. coli* SA 5 en milieu sulfamidé à 5 g/l, depuis des inoculats dilués successivement au dixième. Mesures au biophotomètre.

Tableau n° 15

Etude de la croissance de E.coli SA 5 en milieu sulfamidé à 5 g/l, à partir de faibles inoculats.

Transmittance mesurée au biophotomètre	log. D.O calculé d'après le tableau p. 40	Temps en heures et minutes, au bout duquel est atteinte la valeur indiquée dans la première colonne.				
		Tube a	Tube b	Tube c	Tube d	Tube e
78	0,11	2.55	10.22	23.10	35.35	43.10
63	0,41	4.25	11.55	24.55	37.25	44.45
40	0,75	6.10	13.35	26.45	39.15	46.10
26	0,93	7.10	14.30	27.40	40.10	47.00
18	1,06	7.55	15.20	28.15	40.45	47.25
6	1,37	9.45	17.45	30.20	42.45	48.45

Nous constatons sur les graphiques n° 14 et 15 que les courbes de croissance sont des droites parallèles. Le temps moyen de génération, calculé depuis ces droites, s'établit à 96 minutes en moyenne, valeur sensiblement différente des valeurs déterminées précédemment, ce qui peut s'expliquer par les différences que présentent les conditions de culture dans les cuves du biophotomètre et dans les tubes.

Nous avons réalisé avec E.coli SA 5 des séries d'inoculats de plus en plus faibles, jusqu'à inoculer seulement quelques bactéries en milieu sulfamidé à 5 g/l. Nous avons pu observer une croissance régulière dans tous les tubes, résultat analogue aux résultats obtenus avec E.coli N.

Nous constatons donc que E.coli SA 5 se comporte comme E.coli N : la multiplication commence dès l'ensemencement, la culture ne présente pas de phase de latence ; le temps de division reste constant jusqu'à la fin de la période de croissance, il est du même ordre pour E.coli SA 5 que pour E.coli N.

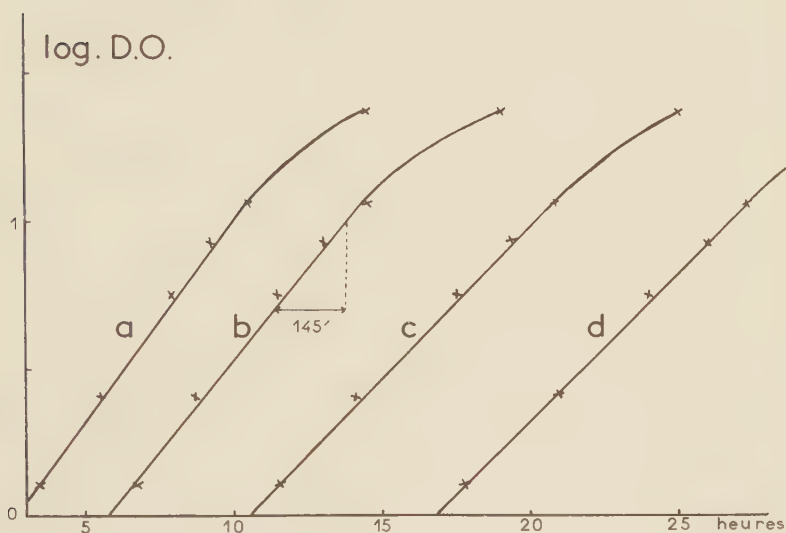
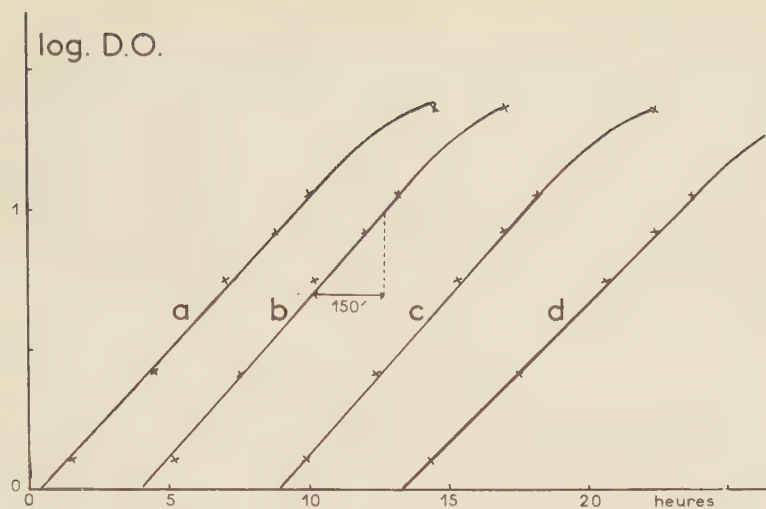
III - ETUDE DU DEBUT DE LA CROISSANCE DE E.COLI SA 10 EN MILIEU SULFAMIDE A 10 g/l.

La croissance de E.coli adapté à 10 g/l de sulfanilamide s'est révélée beaucoup plus irrégulière ; en effet, si un inoculat réalisé dans des conditions standardisées, donne toujours une culture, un inoculat 100 fois plus faible ne permet pas une croissance régulière. Il semble qu'avec cette souche, l'influence de l'inoculat devienne prépondérante.

Nous avons donc étudié la croissance de E.coli SA 10 en réalisant des inoculats plus abondants que pour les deux autres souches, en partant d'une culture de 24 heures pour obtenir des bactéries se trouvant en fin de croissance exponentielle.

Les tableaux et graphiques n° 16 et 17 rapportent les résultats obtenus au biophotomètre, en utilisant les inoculats suivants pour 10 ml de milieu sulfamidé à 10 g/l :

Firole a = 0,50 ml
 Firole b = 0,25 ml
 Firole c = 0,10 ml
 Firole d = 0,05 ml.



Graphiques 16 et 17 - Croissance de *E. coli* SA 10 en milieu sulfamidé à 10 g/l. Mesures au biophotomètre.

Nous constatons que pour des inoculats allant jusque 0,05 ml pour 10 ml de milieu, les courbes ont la même allure que pour *E. coli* N et SA 5 ; la croissance commence dès l'ensemencement et se poursuit régulièrement, sans présenter de phase de latence ; cependant la partie terminale n'est plus rectiligne, la croissance s'effectuant alors à un taux plus réduit. Le temps moyen de génération, calculé graphiquement, est voisin de 2 h 30.

Pour des inoculats inférieurs à 0,05 ml, la croissance ne s'établit pas régulièrement et peut présenter une phase de latence plus ou moins longue, atteignant parfois cinq jours et même dans certains cas, nous n'observons pas de croissance. Il semblerait donc que l'inoculat apporte avec lui des principes qui favorisent la croissance de *E. coli* SA 10. Nous avons cherché si l'addition de diverses substances, en particulier des antisulfamides, per-

mettrait une croissance normale à partir d'inoculats faibles (0,01 ml) : l'addition d'acides aminés (méthionine, glycocolle, sérine, acide glutamique, acide aspartique, cystéine) ou de facteurs de croissance (acide para-aminobenzoïque, acide folique, biotine, riboflavine, vitamine B12, pyridoxal, aneurine, amide nicotinique) ou de thymine, à la dose de 0,1 et 1 mg par ml de milieu sulfamidé à 10 g/l, n'a pas eu de résultat. Mais l'inoculat est susceptible d'introduire dans le milieu bien d'autres composés chimiques, connus ou non, nécessaires pour que les bactéries régénèrent de façon assez rapide leurs capacités reproductrices initiales, ainsi que le suggèrent Marchal et coll (189) ; cependant l'addition de 0,2 ml de filtrat d'une culture de E.coli SA 10 de 24 heures ne favorise pas, dans nos conditions expérimentales, la croissance de E.coli SA 10 à très faible dose.

Tableaux n° 16 et 17

Etude de la croissance de E.coli SA 10 en milieu sulfamidé à 10 g/l.

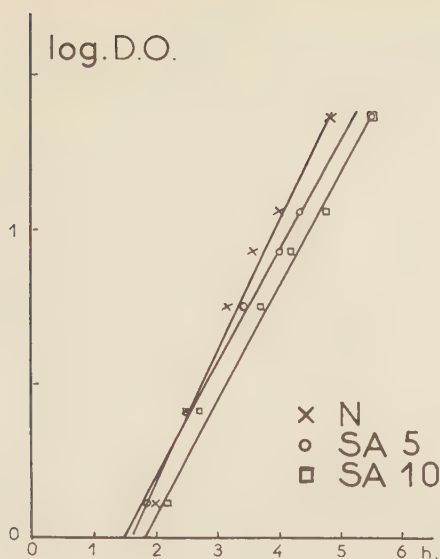
n° 16

Transmittance mesurée au biophotomètre	log. D.O calculé d'après le tableau p. 40	Temps en heures et minutes, au bout duquel est atteinte la valeur indiquée dans la première colonne			
		Fiole a	Fiole b	Fiole c	Fiole d
78	0,11	1.30	5.10	9.50	14.15
63	0,41	4.30	7.30	12.25	17.30
40	0,75	7.00	10.10	15.20	20.37
26	0,93	8.50	12.00	17.00	22.25
18	1,06	10.00	13.10	18.15	23.45
6	1,37	14.30	17.00	22.20	27.20
<u>n° 17</u>					
78	0,11	3.30	6.45	11.35	17.45
63	0,41	5.30	8.40	14.05	21.00
40	0,75	7.50	11.25	17.30	24.00
26	0,93	9.10	13.00	19.25	26.00
18	1,06	10.30	14.30	20.50	27.20
6	1,37	14.30	19.00	25	31.30

Nous ne pouvons donc pas préciser pourquoi il faut un inoculat de E. coli N ou SA 5 pour obtenir une croissance correcte dans le milieu auquel ces microorganismes sont adaptés, car comme nous allons le voir au paragraphe IV, en milieu non sulfamidé, la croissance des trois souches est très voisine.

IV - COMPARAISON DE LA CROISSANCE DES TROIS SOUCHES EN MILIEU NON SULFAMIDE.

Nous montrons dans le tableau n° 18 et le graphique n° 18 que les souches E.coli SA 5 et SA 10 cultivées trois fois en milieu non sulfamidé pour éliminer les traces de sulfanilamide que pourrait apporter l'inoculat, donnent une croissance très voisine de celle de E.coli N. Ces souches ont cependant conservé leur résistance à la sulfanilamide ; ainsi l'acquisition de la sulfamidorésistance n'a pas modifié la vitesse de multiplication du microorganisme, ce qui laisse présager que son métabolisme n'a pas été profondément altéré.



Graphique 18 - Croissance des souches E.coli N, SA 5, SA 10 en milieu non sulfamidé. Mesures au biophotomètre.

Tableau n° 18

Etude comparée de la croissance des trois souches en milieu non sulfamidé.

Transmittance mesurée au biophotomètre	log. D.O calculé d'après le tableau p. 40	Temps en heures et minutes, au bout duquel est atteinte la valeur indiquée dans la première colonne.		
		N	SA 5	SA 10
78	0,11	2	1.50	2.10
63	0,41	2.30	2.30	2.40
40	0,75	3.10	3.25	3.40
26	0,93	3.35	4	4.10
18	1,06	4	4.20	4.30
6	1,37	4.50	5.30	5.30

V - ETUDE DU DEBUT DE LA CROISSANCE DE E.COLI N EN MILIEU SULFAMIDE.

Nous avons vu, lors de l'étude de la sensibilité de E.coli N à la sulfanilamide (page 23) que la croissance est d'autant plus faible que la concentration en sulfanilamide est plus élevée.

Nous avons suivi au néphélomètre la croissance de E.coli N inoculé dans des milieux renfermant des quantités croissantes de sulfanilamide, résultats qui figurent au tableau n° 19 et graphique n° 19.

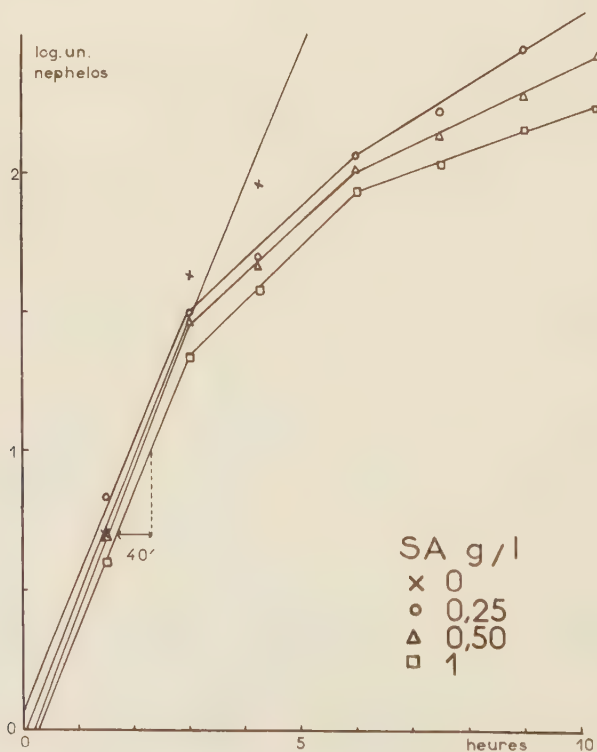
Tableau n° 19

Etude néphélométrique du début de la croissance de *E. coli* N en présence ou non de sulfanilamide.

Les valeurs exprimées sont les log. des unités néphélos.

Temps en heures et minutes.	Concentration en SA g/l			
	0	0,25	0,50	1
1.30	0,70	0,84	0,70	0,60
3	1,64	1,50	1,47	1,34
4.15	1,96	1,70	1,67	1,58
6	illisible	2,06	2,01	1,93
7.30		2,22	2,13	2,03
9		1,44	2,28	2,15
11		illisible	2,42	2,23

Ces courbes montrent que pendant les trois premières heures, la présence de la sulfanilamide ne gêne pas la division qui s'effectue en 40 minutes environ, et 4 ou 5 générations se succèdent à ce rythme ; c'est seulement à ce moment que la sulfanilamide fait sentir son effet et ralentit progressivement la croissance.



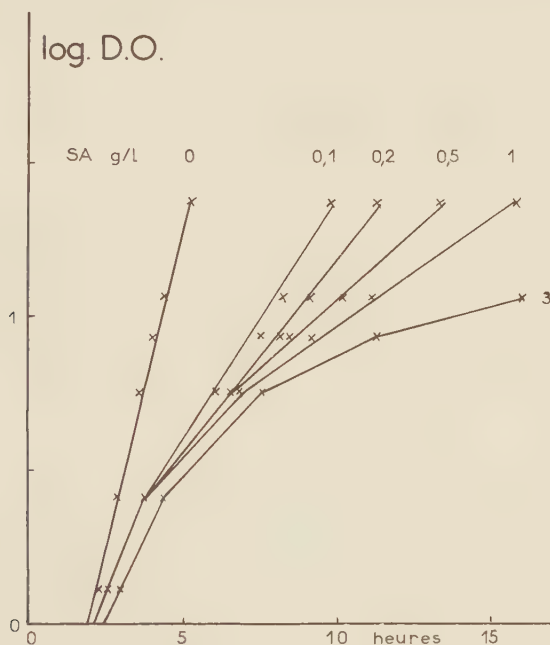
Graphique 19 - Croissance de *E. coli* N en milieu sulfamidé ou non sulfamidé. Mesures au néphélomètre.

Nous avons voulu analyser ce phénomène sur un plus large éventail de concentrations en sulfanilamide et sur des temps de culture plus longs, rendant l'emploi du néphélomètre inadéquat. Nous avons donc utilisé le biophotomètre ; les résultats sont rapportés au tableau et graphique n° 20.

Tableau n° 20

Etude au biophotomètre de la croissance de *E. coli* N en présence ou non de sulfanilamide.

Transmittance mesurée au biophotomètre	log. D.O. calculé d'après le tableau p. 40	Temps en heures et minutes, au bout duquel est atteinte la valeur indiquée dans la première colonne.					
		0	0.10	0.20	0.50	1.00	3.00
78	0,11	2.15	2.30	2.30	2.30	2.30	3
63	0,41	2.50	3.54	3.45	3.45	3.45	4.20
40	0,75	3.35	6.00	6.30	6.30	6.40	7.35
26	0,93	4.00	7.30	8.10	8.20	9.10	11.15
18	1,06	4.22	8.15	9.10	10.10	11.05	16
6	1,37	5.15	9.50	11.15	13.20	15.45	-



Graphique 20 - Croissance de *E. coli* N en milieu sulfamidé ou non sulfamidé. Mesures au biophotomètre.

Les conditions expérimentales étant différentes, les résultats ne sont pas exactement superposables à ceux de la néphélométrie. Cependant, il est très net que durant les premières heures de la croissance, la présence de la sulfanilamide ne modifie qu'à peine la vitesse de multiplication ; celle-ci se ralentit ensuite et s'établit à un taux d'autant plus faible que la concentration en sulfanilamide est plus élevée.

Ces résultats nous font penser que l'inoculat contient des molécules nécessaires à la division cellulaire et dont le renouvellement est plus ou moins inhibé : quelques divisions sont alors possibles à un rythme normal, au début de la culture, parce que le stock contenu dans chaque cellule est suffisant pour assurer quatre ou cinq générations.

Puisque la division cellulaire reste possible, on peut penser que la synthèse des molécules indispensables (acide folique ?) a toujours lieu, mais à une vitesse d'autant plus ralentie que la concentration en sulfanilamide est plus élevée ; la loi d'action de masse rendrait compte d'un tel phénomène si on admet que la sulfanilamide se combine de façon réversible à un précurseur des molécules indispensables à la division ; si ces molécules étaient synthétisées par une autre voie, la vitesse de multiplication devrait être constante, quelle que soit la concentration en sulfanilamide.

De même, si la sulfanilamide devait faire apparaître par mutation ou sélectionner des microorganismes insensibles, la vitesse de multiplication ne devrait pas se modifier ; dans ce cas, nous pourrions observer une croissance de toutes les bactéries durant quelques générations puis un long palier avant que les organismes résistants puissent continuer leur croissance de façon mesurable et nous pouvons penser que l'ensemble de la population bactérienne continue à se multiplier malgré la présence de la sulfanilamide. Nous retrouvons ainsi les résultats de Kohn et Harris (156), de Sevag et Ishii (273) et de Bonét-Maury (33) qui montrèrent que les sulfamides sont doués d'une action bactériofrénatrice entraînant une diminution de la vitesse de croissance, d'où une prolifération suivant un rythme ralenti mais régulier.

VI - ETUDE DE L'INFLUENCE DE L'AERATION SUR LA CROISSANCE DES TROIS SOUCHES DE E.COLI.

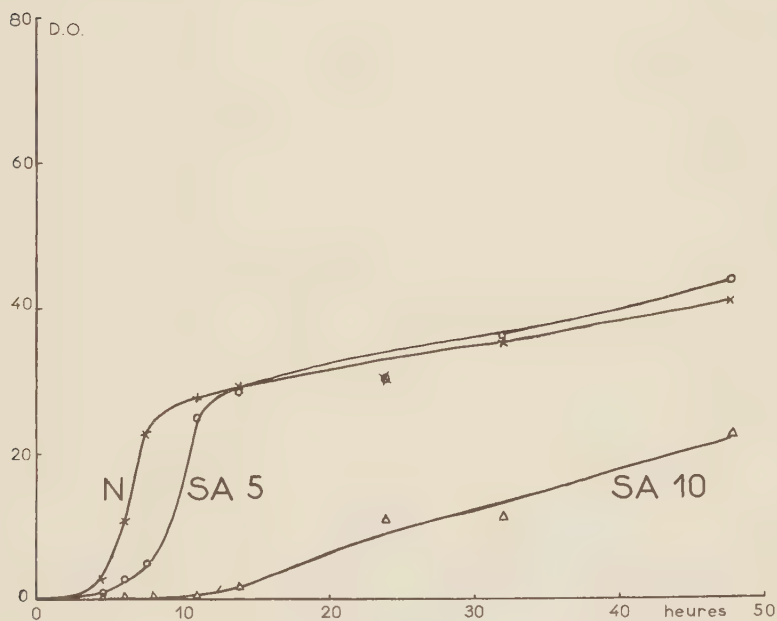
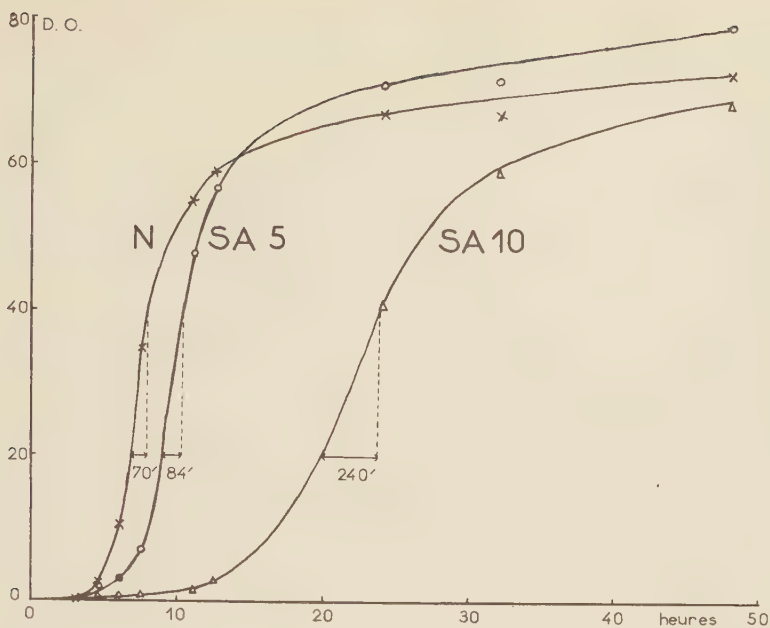
Nous avons signalé, page 17, que l'aération du milieu de culture favorisait la croissance bactérienne ; nous avons voulu étudier le comportement de E.coli SA 5 et SA 10 dans ces conditions en comparant les croissances obtenues en milieu non aéré (cultures réalisées dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml contenant 150 ml de milieu, bouchées au coton) et en milieu aéré (cultures réalisées en ballon de 250 ml contenant 150 ml de milieu brassé par un courant d'air assez rapide de 100 bulles à la minute).

Les résultats sont donnés par le tableau n° 21 et les graphiques n° 21 et 21 bis.

Tableau n° 21

Croissance des souches E.coli N, SA 5 et SA 10 en milieu respectivement N, SA 5, SA 10, aéré et non aéré. (D.O.)

Temps en heures et minutes.	Milieu aéré			Milieu non aéré		
	N	SA 5	SA 10	N	SA 5	SA 10
3	0	0	0	0	0	0
4.30	3	2	1	3	1	0
6	10,5	3	1	11	3	0
7.30	35	7	1	23	5	0
11	55	48	1,5	28	25	0,5
12.30	59	57	2,5	30	28	1,5
24	67	71	41	31	30	11,5
32	67	72	59	35	36	11,5
48	73	80	69	41	44	22,5



Graphiques 21 et 21 bis - Comparaison de la croissance des trois souches E.coli N, SA 5 et SA 10.

n° 21 : en milieu aéré - n° 21 bis : en milieu non aéré.

Ce tableau fait ressortir l'influence de l'aération qui favorise la croissance de façon très nette, aussi bien pour la souche sensible que pour les souches sulfamidorésistantes, la densité optique atteinte étant beaucoup plus élevée.

On peut penser que l'oxygène apporté en excès favorise le métabolisme en poussant les oxydations au maximum, jusqu'au stade CO_2 qui est lui-même éliminé ; il est possible également que le courant d'air entraîne des substances volatiles qui seraient toxiques par leur accumulation dans le milieu de culture.

En milieu aéré, nous constatons que les trois souches atteignent sensiblement la même densité optique après 48 heures de culture ; *E.coli* N et SA 5 présentent une croissance plus rapide que *E.coli* SA 10, ce qui se traduit par des temps de génération différents ; calculés graphiquement ils s'établissent à 70 minutes pour *E.coli* N, 84 minutes pour *E.coli* SA 5 et 240 minutes pour *E.coli* SA 10. Nous constatons que *E.coli* SA 5 présente une croissance très voisine de celle de *E.coli* N, ce qui nous permet de conclure que notre souche est bien adaptée à la concentration de 5 g/l de sulfanilamide. L'adaptation à la concentration de 10 g/l est moins bonne, mais malgré tout, nous pouvons parler d'adaptation puisque cette dose inhibe complètement la croissance de *E.coli* N.

En milieu non aéré, nous constatons que la densité optique atteinte est plus faible, mais du même ordre pour *E.coli* N et SA 5 alors que *E.coli* SA 10 présente une croissance moindre, vraisemblablement par intoxication du milieu de culture.

En conclusion, nous avons étudié la croissance de *E.coli* sur notre milieu de culture synthétique et nous avons montré que la croissance s'établit à un taux régulier dès l'inoculation, sans présenter de latence ; nous pensons que la phase de latence fréquemment signalée est un artefact dû au manque de sensibilité des appareils. L'utilisation de la néphélométrie, plus sensible que la spectrophotométrie, nous a permis de mettre en évidence la croissance immédiate des bactéries inoculées.

Nous avons retrouvé les mêmes faits pour nos souches résistantes à la sulfanilamide dont la croissance peut être représentée par une droite en coordonnées semi-logarithmiques. Les pentes des différentes droites montrent que le temps moyen de génération varie cependant, pour une même souche, d'une expérience à l'autre en fonction de facteurs difficilement contrôlables ; toutefois nous constatons que *E.coli* SA 5 présente un temps de génération un peu plus long mais voisin de *E.coli* N, alors que celui de *E.coli* SA 10 est beaucoup plus long. En milieu non sulfamidé, les trois souches ont des temps de génération très voisins.

La culture de *E.coli* N en présence de différentes concentrations de sulfanilamide nous a montré que la croissance se poursuit à un rythme normal et régulier durant quelques générations puis se ralentit de plus en plus quand le taux de la sulfanilamide augmente ; ceci nous a amené à conclure que l'ensemble de la population bactérienne croît en présence de la drogue et qu'il n'y a pas sélection ou production de mutants sulfamidorésistants, ce qui vient confirmer nos conclusions du chapitre II.

Enfin, nous avons étudié l'influence de l'aération qui permet une croissance plus abondante mais toujours régulière et sans latence aussi bien pour la souche sensible que pour les souches résistantes.

CHAPITRE IV

ÉTUDE DE LA PÉNÉTRATION DE LA SULFANILAMIDE DANS LA CELLULE DE E. COLI SENSIBLE ET RÉSISTANT

Parmi les théories qui ont été proposées pour rendre compte de la résistance aux drogues, il en est qui postulent l'impossibilité pour la drogue de pénétrer dans les cellules par suite d'une modification de la perméabilité de leur membrane. Ce problème, difficile à résoudre avec les méthodes classiques, a pu être abordé, parfois avec succès, grâce à l'emploi des radioisotopes.

La pénicilline a été le plus souvent utilisée ; Maass et Johnson (178-179) montrèrent que *Saccharomyces cerevisiae* n'absorbe pas de pénicilline et conclurent qu'une des raisons de l'insensibilité de la levure à cet antibiotique vient du fait que celui-ci ne traverse pas la membrane ; avec *Staphylococcus aureus*, ils mirent en évidence deux sortes de fixation, une fixation spécifique d'environ 0,8 unités/ml, qui est indépendante de la concentration dans le milieu, et une diffusion à l'intérieur de la cellule où la concentration atteint le même taux qu'à l'extérieur. Cependant, des staphylocoques résistants à 120 un./ml semblent avoir perdu la capacité d'absorber spécifiquement la pénicilline mais peuvent encore la laisser diffuser dans le liquide intracellulaire.

Rowley et coll (251) calculèrent que la quantité de pénicilline fixée par un *Staphylococcus aureus* est voisine de 10 molécules et paraît insuffisante pour expliquer l'action bactéricide. Cooper et Rowley (56) montrèrent que la fixation de la pénicilline augmente en même temps que la concentration dans le milieu extérieur et que les staphylocoques sensibles retiennent plus de pénicilline que les résistants. Ils constatèrent également (57) que les membranes ne fixent pas de pénicilline et Cooper (58) émit l'hypothèse d'une fixation sur les lipoprotéines situées sous la membrane cellulaire. Eagle et coll (82) montrèrent que des souches d'*Escherichia coli* insensibles à la pénicilline, fixent peu de pénicilline quand la concentration est faible dans le milieu extérieur, alors que des souches très sensibles, *Streptococcus pyogenes*, en fixent d'emblée de fortes quantités ce qui semblerait indiquer que les groupes de fixation spécifique sont rapidement saturés ; cependant, avec de fortes concentrations dans le milieu extérieur, les organismes sensibles et insensibles retiennent des quantités de pénicilline du même ordre de grandeur. Ils constatèrent également que la membrane ne semble pas jouer de rôle car des extraits cellulaires, obtenus par ultrasons, fixent autant de pénicilline que les bactéries intactes. Eagle (83) avait pensé pouvoir expliquer l'insensibilité de certaines bactéries à la pénicilline par une diminution de l'affinité entre un composant cellulaire et la pénicilline, mais des souches résistantes peuvent fixer autant de pénicilline que les souches sensibles dont elles dérivent et de ce fait le mécanisme proposé pour expliquer la résistance ne s'avère pas valable dans tous les cas.

Plusieurs auteurs ont étudié la question de la pénétration avec des sulfamides marquées ; Lacassagne et coll (159) montrent que *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus hemolyticus* mais non *Escherichia coli*, fixent de la sulfamidopyrine. Cependant Klotz et Melchior (153) décèlent une faible fixation par *E. coli*.

Noll et coll (222) montrent que cette fixation de sulfanilamide par *E. coli* est fortement diminuée si la culture est effectuée en présence de PAB, ce qui pourrait s'expliquer par l'antagonisme PAB-sulfamide pour certains récepteurs cellulaires.

Perchkine et Chtcherbakova (229) étudiant la fixation de sulfamides par différentes bactéries placées dans diverses conditions de culture, montrent que la concentration en sulfamide dans les bactéries est approximativement égale à celle du milieu de culture. D'autre part, contrairement à ce qu'avait signalé Noll, ces auteurs montrent que le PAB ne s'opposerait pas à la fixation de sulfamide et "on a même l'impression qu'en présence de PAB, le sulfazol s'accumule dans les cellules bactériennes en plus grandes quantités. Ainsi il n'y a pas de raison de relier l'action antisulfamide du PAB à l'inhibition de la propriété d'accumuler les préparations de sulfamides".

Wacker et coll (306) travaillant avec *Enterococcus stei* et *B. coli* sensibles et résistants aux sulfamides, constatent que les souches résistantes fixent des quantités 2 à 3 fois plus élevées que les souches sensibles ; la molécule de sulfamide ne serait pas modifiée à l'intérieur de la bactérie, car la radioactivité retrouvée reste imputable à la sulfamide sauf chez *Enterococcus*, où 5 % se retrouve sous une forme qui n'a pas encore été élucidée. Le PAB n'influe pas sur la quantité de sulfamide fixée par les bactéries sensibles alors qu'il déplace la sulfamide fixée par les organismes résistants, ce qui permet à Wacker de conclure que la liaison récepteur-sulfamide serait plus lâche que la liaison récepteur-PAB chez les bactéries résistantes.

Devant ces résultats plus ou moins contradictoires, nous avons voulu chercher à préciser si la sulfanilamide était fixée par *E. coli*, si la quantité fixée dépendait de la résistance, s'il y avait effectivement une pénétration intra-cellulaire.

Le dosage chimique par la réaction classique de Bratton et Marshall (396) pourtant très sensible, ne permet pas l'étude de la fixation de la sulfanilamide à l'intérieur même des bactéries. Nous avons donc entrepris cette étude avec de la sulfanilamide marquée au soufre.

Avant d'exposer les résultats que nous avons obtenus, il nous semble nécessaire de donner quelques indications sur l'utilisation des radioisotopes en nous limitant aux travaux réalisés avec du soufre radioactif.

S^{35} est un nuclide émettant un rayonnement β mou d'énergie égale à 0,168 million d'électron-volt (Mev). Cette faible énergie le rapproche de l'isotope le plus fréquemment utilisé dans le domaine de la Biologie, le carbone C^{14} d'énergie égale à 0,155 Mev, de sorte que les mesures effectuées avec S^{35} seront soumises aux mêmes servitudes que les mesures avec C^{14} ; cependant les corps renfermant S^{35} sont plus stables que ceux qui contiennent C^{14} et aucun auteur n'a signalé de pertes de comptage par échange, comme cela se produit avec C^{14} qui s'échange avec C^{12} du gaz carbonique de l'atmosphère.

La période de S^{35} de 87 jours est suffisamment longue pour ne pas nécessiter de corrections, dues à la décroissance de la radioactivité, dans des expériences de courte durée.

La préparation des échantillons et la mesure de la radioactivité nécessitent de nombreuses précautions pour conduire à des résultats corrects.

a) Préparation des échantillons.

La manière d'opérer la plus rigoureuse consiste à transformer le soufre en sulfate, qui sera insolubilisé et recueilli sous forme de sulfate de baryum ou de benzidine, exempts d'impuretés. L'oxydation peut être pratiquée selon la méthode classique de Carius, par fusion avec du peroxyde de sodium dans une bombe de Parr ou par oxydation à l'aide de nitrate de cuivre et nitrate de magnésium (Machlin et coll 181) ou par un mélange nitroperchlorique (Eldjarn et Nygaard 87, Walkenstein et Knebel, 309). Durant ces opérations, il faut éviter des pertes par formation de corps soufrés volatils (H_2S , SO_2 , CS_2) qui en outre contamineraient le laboratoire (Erichsen et Muller, 89). Une méthode d'oxydation par combustion dans l'oxygène préconisée récemment par Lysyj et Zarembo (177) permettrait d'obtenir en quelques minutes, la transformation quantitative du soufre organique en sulfate.

Le sulfate obtenu est isolé en ajoutant un sulfate entraîneur, non radioactif, de façon à récolter une quantité suffisante de produit.

Le précipité est recueilli par filtration sur des disques de papier filtre qui seront directement utilisés pour la mesure de la radioactivité après dessiccation et pesée (Henriques et coll, 123,) ; il arrive cependant que le sulfate de baryum ne soit pas totalement retenu par le papier filtre et Kohman (155) recommande l'addition d'un liant pour obtenir un précipité plus cohérent (colodion à 2 % dans le méthanol). La transformation en sulfate de benzidine, recommandée par Young et coll (329) éviterait cet écueil. On peut aussi récolter le précipité par centrifugation dans des tubes spéciaux dont le fond démontable est utilisé comme cupule (Larson et coll, 166,).

Ces diverses opérations sont délicates et souvent difficiles à réaliser dans des expériences biologiques où les mesures doivent être nombreuses. Aussi la plupart des auteurs opèrent-ils sur des échantillons naturels sans se préoccuper sous quel état se trouve le soufre. Les mesures sont alors effectuées sur des liquides ou suspensions étalés sur des cupules puis séchés.

Le montage de ces cupules peut être réalisé suivant différents procédés, dépôt en spirale selon Calvin et coll (44), dépôt étalé dans l'épaisseur d'un papier à nettoyer les verres de lunettes (42), dépôt rendu homogène en utilisant des agents abaisseurs de tension superficielle tels qu'alcool ou lauryl-sulfonate d'ammonium. La répartition du dépôt sur un disque de papier nécessite souvent l'addition d'un produit qui fera adhérer le papier à la cupule lors de la dessiccation, saccharose à 5 %, glucose à 20 % (291) agar-agar (74).

L'évaporation des solutions est généralement réalisée sous une lampe à infrarouge. Selon Calvin, la réalisation de dépôts homogènes est très délicate pour des suspensions présentant un poids inférieur à $2,5 \text{ mg/cm}^2$; les particules ont tendance à se déposer sur les bords de la cupule, aussi il est important d'utiliser des cupules très propres, à fond parfaitement plan et de réaliser l'évaporation à une température assez faible, 40° à 60° , à l'abri des courants d'air. Selon Melchior et Goldkamp (203) les modalités de l'évaporation de liquides sur des disques de papier sont importantes car de fortes différences d'activité peuvent se manifester entre les deux faces ; aussi Wagner et coll (308) préconisent-ils la mesure de l'activité de tels dépôts dans un compteur 4π .

La réalisation de dépôts en couche mince présente l'avantage de ne pas nécessiter de corrections de self-absorption ; pour de faibles volumes voisins de 0.2 ml, les forces de tension superficielle sont généralement suf-

fisantes pour donner un dépôt homogène sur une faible surface durant la dessiccation.

b) Mesure de la radioactivité.

La mesure du rayonnement β est réalisée avec un compteur Geiger-Muller ; mais S^{35} étant un émetteur de faible énergie, il est nécessaire d'utiliser un compteur à fenêtre mince pour arrêter le moins possible le rayonnement. L'usage de compteurs à courant gazeux, où l'échantillon est placé à l'intérieur même du compteur, permettrait d'obtenir un meilleur rendement des mesures.

1/ Efficience des systèmes de comptage.

L'appareillage électronique qui amplifie et enregistre les impulsions reçues du compteur, peut présenter des fluctuations dans son rendement ; ces variations sont faciles à détecter si l'on a soin de vérifier de temps à autre l'ensemble de l'installation avec un étalon fixe à base de U_3O_8 .

D'autre part, des pertes de coïncidence se produisent quand l'activité à mesurer est élevée ; négligeables pour des activités inférieures à 2500 coups à la minute (59) elles peuvent atteindre 10 % à 4000 coups à la minute (c/mn) (142).

2/ Géométrie dans les mesures.

Il est indispensable d'opérer les mesures dans des conditions toujours semblables : surface de l'échantillon, répartition homogène du dépôt, distance à la fenêtre du compteur, une différence de 1 mm pouvant introduire une erreur de 5 % avec C^{14} ou S^{35} , Kamen (142).

3/ Influence du support et de la nature de l'échantillon.

La nature de la cupule intervient dans la mesure de la radioactivité car elle réfléchit plus ou moins le rayonnement émis (134-283-220) ; cet effet appelé rétrodiffusion est plus faible en utilisant des supports en Al ou Cu (263).

La nature et l'importance du résidu sec dans lequel est répartie la substance radioactive intervient également ; c'est ainsi que les sels minéraux, s'ils sont relativement abondants, augmentent la radioactivité apparente par effet d'éparpillement ou "self scattering", augmentation qui peut atteindre 30 % pour des dépôts inférieurs à 2 mg/cm² (262).

4/ Influence du poids de l'échantillon.

Cette influence est prépondérante dans le cas du S^{35} comme avec C^{14} , tous deux émetteurs de rayonnement β de faible énergie car la matière absorbe une partie du rayonnement qu'elle émet ("self-absorption"). Chaque expérimentateur doit déterminer le coefficient de self absorption correspondant à ses conditions expérimentales.

Les rayons β de S^{35} étant arrêtés par une épaisseur de 0,1 mm d'eau, il faut se méfier de l'hygroscopicité de certains échantillons ; la mesure de la radioactivité d'un rayonnement β mou ne peut donc s'effectuer que sur des dépôts parfaitement secs et conservés secs.

5/ Précision du comptage.

L'émission du rayonnement par les radioisotopes étant irrégulière, la précision des mesures dépend du nombre de désintégrations enregistrées et il a été démontré que l'erreur moyenne pour cent est donnée par la formule $100/\sqrt{N}$ où N est le nombre de coups enregistrés, ce qui nous montre que pour obtenir une précision d'environ 3 %, il est nécessaire de compter 1000 coups.

La durée des mesures de chaque échantillon doit donc être calculée en fonction de sa radioactivité et du bruit de fond correspondant à la radioactivité ambiante, enregistrée par le compteur, valeur qui doit évidemment être retranchée de toutes les mesures effectuées ; aussi la mesure de faibles radioactivités est-elle particulièrement délicate et nécessite-t-elle 40 minutes pour obtenir une précision de 3 % sur un échantillon donnant 25 coups à la minute ; pour des activités encore plus faibles, de l'ordre de 2 coups à la minute (c/mn), il devient pratiquement impossible de réaliser des mesures correctes sans un dispositif spécial (142).

TRAVAUX PERSONNELS

I - MATERIEL ET TECHNIQUES UTILISES.

La sulfanilamide marquée au soufre, que nous avons utilisée, nous a été livrée par le Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay (France), garantie pure, exempte en particulier d'acide sulfurique et d'acide sulfalinique ; en effet, il était important que le produit ne renferme pas d'ion sulfate qui, métabolisé par les bactéries, viendrait fausser les résultats.

Au début de nos expériences, nous avons utilisé un produit d'activité spécifique assez faible dont 1 $\mu\mu\text{g}$ donnait, dans nos conditions de mesure, une activité de 0,5 c/mn. Par la suite, nous avons obtenu une sulfanilamide dont l'activité était de 6 c/mn par $\mu\mu\text{g}$.

La sulfanilamide est dissoute dans de l'eau stérile pour préparer une solution-mère dont la concentration est déterminée par le dosage classique selon la méthode de Bratton-Marshall. Cette solution est ensuite ajoutée en quantité voulue dans les fioles de culture préalablement stérilisées.

Les cultures sont généralement réalisées en ballons de 100 ml contenant 50 ml de milieu, munis d'un bouchon de caoutchouc avec double tubulure pour réaliser l'aération du milieu.

Après culture, le volume recueilli est ramené à sa valeur initiale par addition d'eau distillée, pour compenser la légère évaporation produite par le courant d'air. Les bactéries sont récoltées par centrifugation dans des tubes en matière plastique durant 15 minutes à 10 000 tours/minute au froid, sauf quand la concentration en sulfamide atteint 10 g/l dans le milieu, ce qui nécessite une centrifugation à température ordinaire pour éviter la précipitation de la sulfamide.

Pour éviter tout risque de contamination, les opérations sont effectuées sur des plateaux métalliques garnis de papier filtre ; toutes les mesures sont réalisées avec des pipettes munies d'une poire en caoutchouc. La décantation des liquides radioactifs s'effectue à l'aide d'un siphon relié à une trompe à vide.

Il nous a tout d'abord fallu établir la courbe de self-absorption de la radioactivité dans nos conditions expérimentales. Nous opérons de la façon suivante :

1 litre de culture de *E. coli* N est centrifugé et les bactéries sont lavées trois fois avec de l'eau distillée pour éliminer les sels minéraux du milieu ; le culot bactérien est remis en suspension dans environ 40 ml d'eau et cette suspension épaisse est diluée à différents taux dans des tubes à essais puis le volume est ajusté à 9 ml dans tous les tubes. Nous ajoutons alors à chaque tube :

Dans une première série : 1 ml d'une solution de sulfamide marquée dont l'activité est voisine de 30 000 c/mn/ml.

Dans une deuxième série : 1 ml d'une solution de sulfamide marquée d'activité voisine de 6 000 c/mn/ml.

Dans chaque série, la radioactivité de base de la suspension est mesurée sur une dilution au 1/10 dans l'eau distillée de la solution de sulfamide marquée.

Les mesures sont ensuite effectuées en triple exemplaire sur une prise d'essai de 1 ml de chaque suspension homogène déposée sur une cupule d'aluminium de 2 cm de diamètre, tarée au préalable au 1/100 de mg, puis évaporée sous une lampe à infrarouge en évitant une action trop rapide ou trop prolongée qui pourrait donner un dépôt non homogène. Dès que les cupules paraissent sèches, elles sont placées durant 12 heures dans un dessiccateur à P_2O_5 .

Les cupules sont de nouveau pesées pour déterminer le poids du dépôt et la radioactivité est mesurée sous un compteur Geiger-Muller à fenêtre de mica de $1,7 \text{ mg/cm}^2$ (tube TGC 2, Tracerlab ; échelles RNU 3, Mesco). Lors d'essais préliminaires nous avons déterminé le rendement du système de comptage (compteur et échelles) connaissant l'activité spécifique de la sulfanilamide fournie ; ce rendement se situe aux environs de 3 % dans nos conditions expérimentales.

La mesure de la radioactivité est réalisée sur 10 000 coups donc avec une précision statistique de $\pm \frac{100}{\sqrt{10\,000}} = \pm 1 \%$.

Le mouvement propre du compteur s'établit à une valeur moyenne de 25 c/mn, valeur qui a été retranchée de toutes les mesures que nous rapportons.

Nous avons tenu à établir la courbe de self-absorption avec deux activités, l'une de 600 coups, l'autre de 3 000 coups à la minute pour vérifier que l'intensité de l'activité mesurée n'a pas d'influence sur le coefficient de self-absorption.

Les résultats des mesures figurent aux tableaux n° 21 bis et n° 22.

Ces mesures nous permettent de calculer le coefficient de correction de self-absorption, c'est-à-dire la valeur par laquelle il faudra multiplier les résultats des mesures effectuées, pour obtenir la radioactivité totale d'un dépôt, compte tenu de son poids. Ces coefficients sont calculés pour un dépôt bactérien étalé sur la surface totale d'une cupule d'aluminium pour se trouver dans les conditions mêmes que nous utiliserons dans nos travaux.

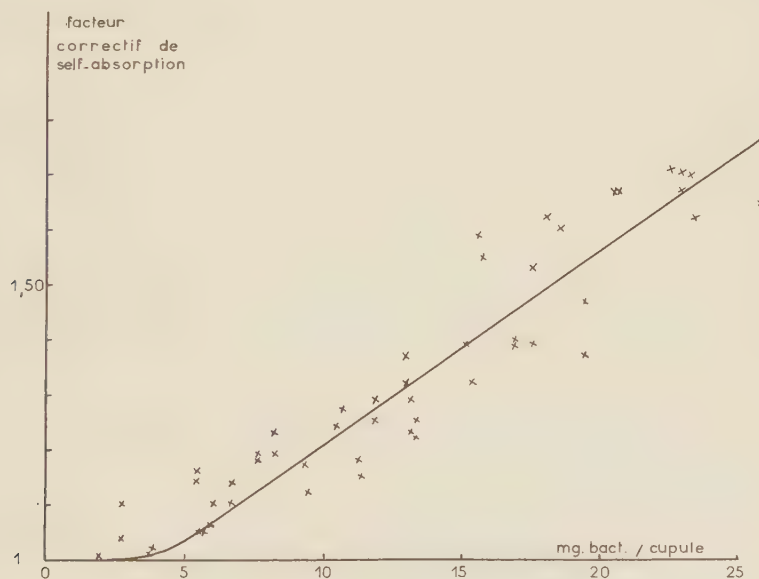
La courbe n° 22 permet d'établir le coefficient moyen de correction pour des dépôts de 0 à 25 mg ; nous constatons que pour des dépôts inférieurs à 4 mg, aucune correction n'est nécessaire.

Tableau n° 21 bis.

Mesure de la self-absorption due à un dépôt bactérien.

Etude réalisée avec une activité moyenne de 600 c/mn.

Expérience n° 1			Expérience n° 2		
Dépôt sec en mg	RA c/mn	Coefficient de correction	Dépôt sec en mg	RA c/mn	Coefficient de correction
0,05	590	1	0,02	558	1
0,12	600	1	0,08	560	1
6,66	535	1,10	1,89	555	1,01
6,72	520	1,14	1,89	575	0,98
13,28	470	1,25	3,72	555	1,01
13,32	485	1,22	3,85	550	1,02
19,39	400	1,47	5,56	530	1,05
19,47	430	1,37	7,52	475	1,18
25,80	360	1,64	7,59	470	1,19
26,06	370	1,60	9,28	480	1,17
			9,43	500	1,12
			11,19	475	1,18
			11,32	487	1,15
			13,10	435	1,29
			13,13	455	1,23
			15,06	403	1,39
			15,31	425	1,32
			16,81	405	1,39
			16,87	400	1,40



Graphique 22 - Courbe de détermination du facteur correctif de self-absorption.

Tableau n° 22

Mesure de la self-absorption due à un dépôt bactérien.

Etude réalisée avec une activité moyenne de 3 000 c/mn.

Expérience n° 1			Expérience n° 2		
Dépôt sec en mg	RA c/mn	Coefficient de correction	Dépôt sec en mg	RA c/mn	Coefficient de correction
0,01	2.550	1	0,03	3.060	1
0,03	2.570	1	0,06	2.900	1
5,92	2.380	1,07	2,71	2.870	1,04
5,99	2.330	1,10	2,72	2.700	1,10
11,79	2.040	1,25	5,38	2.560	1,16
11,81	1.980	1,29	5,42	2.620	1,14
17,48	1.840	1,39	8,12	2.410	1,23
17,52	1.670	1,53	8,15	2.500	1,19
22,90	1.530	1,67	10,46	2.400	1,24
23,37	1.580	1,62	10,60	2.340	1,27
			12,88	2.260	1,32
			12,96	2.180	1,37
			15,50	1.880	1,59
			15,64	1.920	1,55
			18,00	1.840	1,62
			18,51	1.875	1,60
			20,50	1.800	1,67
			20,62	1.790	1,68
			22,87	1.740	1,71
			23,18	1.760	1,70

II - ETUDE DE LA FIXATION DE LA SULFANILAMIDE PAR E.COLI.

A - FIXATION DE SULFANILAMIDE PAR E.COLI EN "RESTING CELLS".

E.coli N, SA 5 et SA 10 sont cultivés durant 12 heures en milieu normal non sulfamidé, avec aération. Au préalable, les souches E.coli SA 10 et SA 5 ont été cultivées 20 fois de suite en milieu non sulfamidé pour éliminer le sulfamide qu'elles pourraient renfermer. Nous avons également vérifié qu'elles avaient néanmoins conservé leur résistance.

Ces cultures arrivées en phase stationnaire sont centrifugées à basse température ; les bactéries sont lavées deux fois avec une solution froide et stérile de chlorure de sodium à 8,5 g/l et citrate de sodium 1 g/l, puis remises en suspension dans une solution contenant tous les éléments minéraux du milieu de culture, mais sans glucose, et différentes doses de sulfanilamide marquée.

Les suspensions ainsi réalisées sont placées une heure à l'étuve à 37° puis les bactéries sont recueillies par centrifugation et lavées 3 fois avec 20 ml d'eau distillée.

Les centrifugations sont réalisées en tubes en matière plastique, sur centrifugeur oblique Jouan tournant à 18 000 t/mn durant cinq minutes ; pour éviter une élévation de température qui risquerait de provoquer la lyse des bactéries, les suspensions sont réalisées dans de l'eau distillée à + 4°C. Il est nécessaire d'utiliser de l'eau et non pas une solution de chlorure de sodium à 8,50 g/l pour éviter les effets de self-scattering.

Les liquides des lavages successifs sont recueillis et leur radioactivité mesurée sur une prise d'essai de 1 ml. Au 3ème lavage, la radioactivité étant devenue négligeable, les bactéries sont remises en suspension dans 3 ml d'eau, suspension dont 1 ml est évaporé, séché, pesé et passé au compteur Geiger-Muller.

Une première expérience est réalisée avec une concentration en sulfanilamide marquée de 37,5 µg/ml.

Une deuxième expérience est réalisée avec une concentration en sulfanilamide de 2037,5 µg/ml, soit 2 000 µg de sulfanilamide non marquée additionnée de 37,5 µg de sulfanilamide marquée. Sachant que les organismes ne font pas de différence dans l'utilisation métabolique des produits radioactifs, nous pourrions évaluer la fixation totale de sulfanilamide d'après la radioactivité qui sera mesurée dans les dépôts.

Les résultats sont rapportés dans les tableaux n° 23 et n° 24.

Tableau n° 23

Fixation de sulfanilamide par E.coli en "resting cells".

1ère expérience avec une concentration de sulfanilamide de 37,5 µg/ml.

Valeurs rapportées à 1 ml	E.coli N	E.coli SA 5	E.coli SA 10
RA de la suspension bactérienne (en c/mn).	14 750	14 230	14 680
RA du centrifugat (en c/mn)	14 050	14 300	12 925
RA du 1er lavage (en c/mn)	290	315	325
RA du 2ème lavage (en c/mn)	8	15	10
RA du 3ème lavage (en c/mn)	0	5	0
Poids sec en mg de 1 ml de suspension finale.	9,19 - 10,30	11,93 - 11,74	11,85 - 11,72
RA de 1 ml de suspension finale (c/mn).	136 - 128	169 - 163	103 - 104
RA corrigée pour la self-absorption (c/mn).	169 - 165	228 - 218	139 - 139
RA c/mn/mg de bactéries sèches.	18,4 - 16	19,1 - 18,6	11,7 - 11,9
mµg de sulfanilamide fixée par mg de bactéries (1 mµg SA = 0,5 c/mn)	36,8 - 32	38,2 - 37,2	23,4 - 23,8
MOYENNE	34,4	37,7	23,6

Tableau n° 24

Fixation de sulfanilamide par *E. coli* en "resting cells".

2ème expérience avec une concentration en sulfanilamide de 2037,5 µg/ml dont 37,5 µg/ml de sulfanilamide radioactive

Valeurs rapportées à 1 ml	<i>E. coli</i> N	<i>E. coli</i> SA 5	<i>E. coli</i> SA 10
RA de la suspension bactérienne (c/mn)	14 450	13 950	14 150
RA du centrifugat (c/mn)	15 200	15 800	15 560
RA du 1er lavage (c/mn)	286	300	270
RA du 2ème lavage (c/mn)	10	11	87
RA du 3ème lavage (c/mn)	2	5	5
Poids sec en mg de 1 ml de suspension finale.	9,58 - 10,47	12,70 - 12,57	12,16 - 12,07
RA de 1 ml de la suspension finale (c/mn)	125 - 109	138 - 146	96 - 100
RA corrigée pour la self-absorption (c/mn)	157 - 141	204 - 200	130 - 135
RA c/mn/mg de bactéries sèches.	16,4 - 13,5	16 - 16	10,7 - 11,2
mµg de sulfanilamide* fixée par mg de bactéries sèches. (1 mµg SA = 0,5 c/mn)	32,8 - 27	32 - 32	21,4 - 22,4
MOYENNE	29,9	32	21,9
mµg de <u>sulfanilamide totale</u> fixée par mg de bactéries sèches.	1 625	1 740	1 190

Dans le cas d'une faible concentration en sulfanilamide (37,5 µg/ml) nous retrouvons en moyenne 28 mµg de sulfanilamide fixée par mg de bactéries sèches. Dans le cas d'une forte concentration (2037,5 µg/ml), les bactéries ont retenu en moyenne 1527 mµg de sulfanilamide par mg.

Ces deux valeurs sont dans un rapport de $\frac{28}{1527} = \frac{1}{54,5}$ égal au rapport des concentrations en sulfanilamide dans les deux expériences $\frac{37,5}{2037,5} = \frac{1}{54,3}$, ce qui tendrait à prouver que, dans nos conditions expérimentales, la quantité de sulfanilamide fixée par les bactéries est proportionnelle à la concentration dans le milieu environnant.

Nous pouvons conclure que *Escherichia coli*, sensible ou sulfamidorésistant, placé en "resting cells", fixe de la sulfanilamide en quantité proportionnelle à la concentration dans le milieu extérieur. Cependant, contrairement à ce qu'a trouvé Wacker et coll (306), les souches sulfamidorésistantes ne fixent pas plus de sulfanilamide que la souche sensible.

B - ETUDE DE LA FIXATION DE SULFANILAMIDE PAR E.COLI DURANT SA CROISSANCE.

Cette étude est réalisée dans les conditions habituelles de croissance avec aération de façon à obtenir une récolte aussi abondante que possible.

Nous décrivons en détail une expérience type :

50 ml de milieu contenant la sulfanilamide, sont inoculés avec 1 ml d'une culture âgée de 20 heures, amenée par dilution à une D.O = 20. Quand la concentration en sulfanilamide est élevée, elle est obtenue par mélange en proportions connues de produit marqué et sulfanilamide inactive. Après une croissance de 14 heures, le volume de la culture est ramené à sa valeur initiale par addition de quelques ml d'eau, pour compenser l'évaporation qui s'est produite. La culture est centrifugée dans des tubes en matière plastique de 50 ml durant 15 minutes à 6 000 t/mn à une température de + 4°C puis un volume défini du liquide surnageant est prélevé en double exemplaire pour une mesure de la radioactivité (RA). Le reste du liquide est décanté par siphonnage en évitant d'entraîner des bactéries, puis les tubes à centrifuger sont retournés et égouttés sur papier filtre durant quelques minutes. Les bactéries sont ensuite lavées 4 fois : le culot est remis en suspension dans environ 1 ml d'eau à l'aide d'un agitateur et le volume est complété à 50 ml avec de l'eau. La suspension homogène ainsi réalisée est centrifugée immédiatement dans les mêmes conditions que précédemment. Deux échantillons de 1 ml de liquide surnageant sont prélevés pour mesure de la RA et le reste du liquide est éliminé par siphonnage. Le cycle des lavages est repris aussitôt pour éviter une lyse des bactéries. Le culot bactérien obtenu après le quatrième lavage est remis en suspension dans 20 ml d'eau et trois échantillons de 1 ml sont prélevés et placés sur des cupules tarées en vue de la mesure de la RA et de la détermination du poids sec. Il reste 17 ml de suspension qui sont utilisés par la suite pour étudier la localisation de la sulfanilamide à l'intérieur des bactéries (page 66).

Nous avons constaté que quatre lavages avec un volume d'eau égal à celui de la culture, sont nécessaires pour éliminer la radioactivité du liquide retenu entre les cellules ; en effet, en admettant qu'à chaque décantation, 1 ml de liquide subsiste entre les cellules et sur les parois du tube, ce qui nous paraît une estimation très large, chaque lavage avec 50 ml d'eau amène une dilution de 1/50 et la radioactivité de l'eau du 3ème lavage devrait être $1/50^3 = 1/125\,000$ de celle du milieu initial, donc négligeable dans nos conditions expérimentales.

Or nous trouvons une radioactivité régulièrement plus élevée que prévu ; c'est ainsi qu'un premier liquide de lavage présentant une RA de 16 400 c/mn/ml donne 475 c/mn/ml au 2ème lavage (théoriquement 328), 60 c/mn/ml au 3ème lavage (théoriquement 6) et 27 c/mn/ml au 4ème lavage (théoriquement 0) : il semble donc que les bactéries retiennent de façon labile de la sulfanilamide qui est libérée progressivement au cours des lavages. Il est donc nécessaire de poursuivre ceux-ci jusqu'à ce que leur radioactivité devienne négligeable.

Le tableau n° 25 rassemble le détail des résultats obtenus lors d'une expérience. Nous avons indiqué la précision statistique (PS) avec laquelle les mesures de RA ont été effectuées. La radioactivité du milieu de culture étant élevée, les mesures ne peuvent être effectuées avec précision qu'à partir du premier lavage.

Différentes expériences réalisées dans ces conditions expérimentales, nous ont donné les résultats rapportés au tableau n° 26. Chaque valeur exprimée représente les μg de sulfanilamide fixée par mg de bactéries sèches, les lavages ayant été réalisés jusqu'à ce que la radioactivité y soit négligeable.

Les graphiques n° 26 et 26 bis rassemblent les résultats.

Tableau n° 25

Fixation de sulfanilamide par E.coli SA 5 durant sa croissance.

Concentration en sulfamide en g/l dans le milieu	0,5			1			5		
RA de 1 ml du décantat du 1er lavage (c/mn) PS = 1 %	1 750	1 700		3 600	3 800		16 400	16 600	
RA de 1 ml du décantat du 2ème lavage (c/mn) PS = 2,2 %	50	56		136	135		475	450	
RA de 1 ml du décantat du 3ème lavage (c/mn) PS = 3,16 %	14	15		36	39		60	64	
RA de 1 ml du décantat du 4ème lavage (c/mn) PS = 3,16 %	7	7		19	20		27	24	
Poids sec de 1 ml suspension finale en mg.	4,53	4,71	4,75	5,26	5,33	5,37	5,83	5,73	5,94
RA de 1 ml de suspension finale séchée (c/mn) PS = 1,4 %	145	190	190	295	295	320	700	705	725
RA corrigée pour la self-absorption (c/mn)	151	198	198	313	313	339	756	761	782
RA c/mn/mg	33	42	42	60	59	63	130	133	132
MOYENNE		39			61			132	
mµg SA/mg de bactéries sèches (1 mµg SA = 6 c/mn)		6,5			10,1			22	
mµg sulfamide totale fixée par mg de bactéries sèches.		195			305			660	

PS = précision statistique des mesures effectuées.

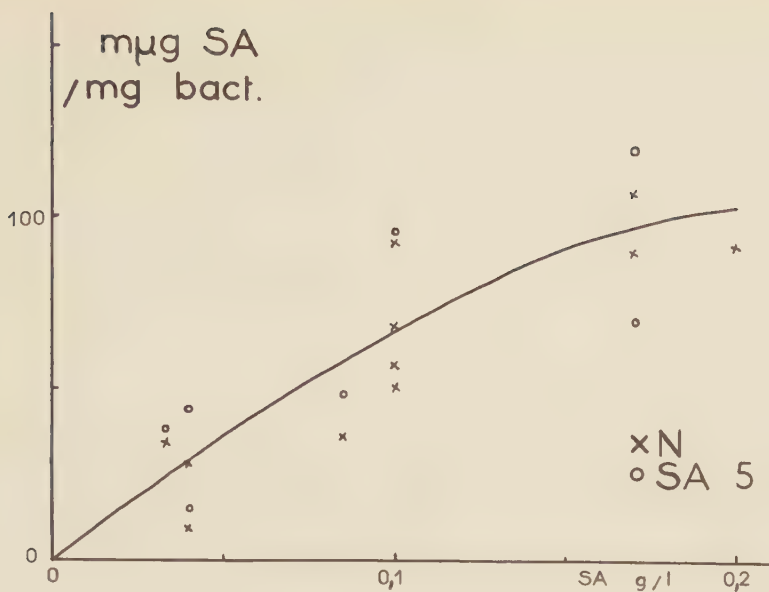
La sulfanilamide utilisée renferme 1/30 de sulfanilamide marquée.

Tableau n° 26

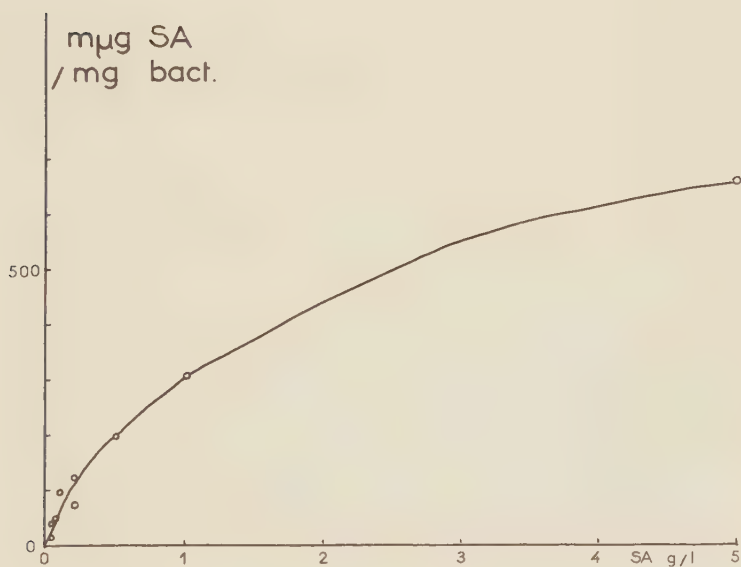
Fixation de sulfanilamide par E.coli durant sa croissance.

(mµg de SA par mg de bactéries sèches).

Concentration SA g/l	E.coli N	E.coli SA 5
0,034	34	38
0,040	9,5 - 28	15 - 44
0,085	36	48
0,100	51 - 57 - 69 - 93	96
0,170	90 - 107	70 - 120
0,200	92	
0,500		195
1,000		305
5,000		660



Graphique 26 - Fixation de sulfanilamide par E.coli N et SA 5 durant la croissance.



Graphique 26 bis - Fixation de sulfanilamide par E.coli SA 5 durant la croissance.

Comme dans le cas précédent des bactéries en resting cells, la fixation est du même ordre pour *E.coli* sensible et sulfamidorésistant. Cependant nous ne retrouvons plus une fixation proportionnelle à la concentration de la sulfanilamide dans le milieu extérieur, les courbes présentant une allure hyperbolique de type Langmuir. Il semble donc que les bactéries se comportent différemment vis à vis de la sulfanilamide, durant leur croissance : on peut supposer que des récepteurs cellulaires, capables de fixer la sulfanilamide sont utilisés dans le métabolisme et de ce fait ne sont plus disponibles ; dans les resting cells, ces récepteurs non utilisés, pourraient ainsi fixer une quantité maximum de sulfanilamide. Il est possible également que la cellule en croissance présente une perméabilité différente de celle de la bactérie au repos.

C - ETUDE DE LA REPARTITION DE LA SULFANILAMIDE FIXEE PAR *E.COLI*.

Les bactéries fixant de la sulfanilamide, il était intéressant d'essayer de situer le lieu de la fixation dans la bactérie elle-même ; c'est ce que nous avons tenté en mesurant la radioactivité des différents extraits obtenus en traitant les bactéries par la méthode indiquée page 93.

L'extraction est réalisée sur les suspensions bactériennes lavées jusqu'à élimination de la radioactivité susceptible de venir du milieu de culture.

La radioactivité des différents extraits est mesurée sur 1 ml ; pour les extraits trichloracétiques, il est nécessaire d'éliminer l'acide trichloracétique (ATC) par deux extractions avec 100 ml d'éther, de façon à obtenir un résidu sec très faible évitant ainsi les corrections de self-absorption.

Il est difficile d'obtenir des résultats quantitatifs dans des expériences de ce genre, étant donné les nombreuses manipulations effectuées.

L'extrait trichloracétique obtenu à froid par contact des bactéries durant 10 heures avec ATC 10 % à + 4° renferme les composés acidosolubles en particulier du glutathion, des nucléotides et des éléments minéraux ; sa radioactivité pourrait s'expliquer par des traces de sulfanilamide non éliminée durant les lavages précédents ou par l'existence de sulfamide libre dans le protoplasme bactérien.

Deux lavages sont réalisés ensuite avec ATC 1 % à + 4° et la radioactivité du deuxième liquide de lavage devient négligeable.

Les extractions alcoolique et étherée, réalisées à 45° extraient une quantité importante de substance radioactive. Ces fractions renferment habituellement des protéines et des lipides.

L'extrait réalisé par ATC 5 % durant 20 minutes au bain-marie bouillant contient les acides nucléiques et ne montre qu'une faible radioactivité, venant probablement de traces du liquide extractif précédent. Le résidu protéique conserve une certaine radioactivité.

Le tableau n° 27 rapporte des résultats obtenus avec les trois souches de *E.coli* cultivées en présence de différentes doses de sulfanilamide.

Tableau n° 27

Radioactivité totale en c/mn des différents extraits de E.coli N,
SA 5 et SA 10, cultivés en présence de sulfanilamide marquée.

Souche	N	SA 5	SA 10	N	SA 5	SA 10	SA 5	SA 10
Concentration SA g/l dans le milieu.	0,040	0,040	0,040	0,170	0,170	0,170	5,100	10,200
RA c/mn des bactéries traitées.	4 700	7 700	7 050	41 000	18 000	26 000	17 200	16 200
RA c/mn de l'extrait trichloracétique à froid.	780	815	1 190	870	1 020	1 130	955	2 430
RA c/mn des 2 lavages avec ATC 1 %.	154	218	205	756	307	398	306	395
RA c/mn des extraits éthéroalcooliques.	2 570	4 790	3 620	27 300	14 300	25 425	12 050	7 570
RA c/mn de l'extrait trichloracétique à chaud.	240	455	255	450	615	1 050	675	120
RA c/mn du résidu protéique.	1 050	-	800	6 100	3 000	4 720	3 320	740
RA c/mn retrouvée au total.	4 794	-	6 070	39 476	18 242	32 723	17 306	11 255

Nous pouvons nous demander à quoi est due la forte radioactivité des extraits éthéroalcooliques : le fait que ces extraits renferment les lipides bactériens serait en faveur d'une fixation de la sulfanilamide par ces lipides ; Cooper (58) a émis une hypothèse semblable pour expliquer la fixation de la pénicilline par des lipoprotéines situées sous la membrane cellulaire du staphylocoque. Mais d'autre part, l'alcool est un très bon solvant de la sulfanilamide, ce qui pourrait expliquer cette forte radioactivité ; cependant, si cette propriété entrait en jeu, les extraits suivants ne devraient plus renfermer de sulfanilamide ; or nous en retrouvons encore dans la fraction protéique. Ce fait nous a surpris et nous avons tout d'abord pensé à une contamination possible de la sulfanilamide par un produit métabolisable qui serait incorporé dans les protéines ; la chromatographie sur papier nous a montré qu'il n'en était rien, la sulfanilamide utilisée ne donnant qu'un seul spot radioactif ; d'autre part, s'il préexistait un produit radioactif utilisable par la bactérie, nous devrions pouvoir le retrouver dans les acides aminés, que ce produit provienne d'une impureté du produit initial ou de la dégradation de la sulfanilamide sous l'influence d'enzymes bactériens.

Nous avons donc hydrolysé les protéines et réalisé une chromatographie sur papier en utilisant le solvant de Clayton (54). Après développement, le chromatogramme révélé à la ninhydrine, permet de localiser les acides aminés ; il est ensuite découpé en carrés successifs de 2 cm de côté dont la radioactivité est mesurée : nous constatons que la radioactivité se répartit au point de dépôt et au voisinage du front du solvant, dans une zone ne contenant pas d'acides aminés. Des chromatogrammes révélés ensuite par la technique de San et Ultee (253) nous ont montré que la sulfanilamide ayant un R_f de 0,90 se situe bien dans cette région ; nous nous sommes aussi assurés que l'hydrolyse chlorhydrique ne détruit pas la molécule de sulfanilamide.

Nous avons également chromatographié l'extrait éthéroalcoolique, avant et après hydrolyse :

Avant hydrolyse, la radioactivité se situe au voisinage du front du solvant et la révélation à la ninhydrine montre à cet endroit, la présence de spots correspondant aux protéines non hydrolysées.

Après hydrolyse, la radioactivité se situe à la même place mais la coloration à la ninhydrine montre les acides aminés répartis le long du chromatogramme dans une région ne présentant pas de radioactivité.

Il est donc vraisemblable que la sulfanilamide fixée par les bactéries n'est pas chimiquement modifiée par elles et s'y trouve bien sous forme de sulfanilamide ; il est difficile d'expliquer sa présence dans le résidu protéique sans penser à une fixation au moins partielle sur la membrane bactérienne, fixation qui pourrait varier d'une culture à l'autre ce qui expliquerait la dispersion des résultats obtenus.

D'autre part, la membrane ne semble pas imperméable à la sulfanilamide, puisque nous en retrouvons dans l'extract éthéroalcoolique contenant les lipides bactériens, et cela aussi bien chez *E.coli* sensible que résistant ; la sulfamidorésistance ne serait donc pas attribuable au fait que la membrane soit devenue imperméable à la sulfanilamide.

La décroissance irrégulière de la radioactivité des liquides de lavage serait en faveur de deux sortes de fixation, analogues à celles que Maass et Johnson (179) mirent en évidence pour la pénicilline, chez *Staphylococcus aureus* : une fixation labile, correspondant vraisemblablement à une simple diffusion dans le liquide cellulaire, dont la rupture dépendrait de l'état des cellules ; une fixation stable, résistante aux lavages : il est possible de concevoir que la molécule de sulfanilamide soit entrée dans un complexe tel que l'acide folique, où elle remplacerait PAB par analogie de structure. Evidemment, ce n'est là qu'une hypothèse que nous nous proposons d'étudier par la suite.

En conclusion, nous avons montré que *E.coli* sensible ou résistant fixe de la sulfanilamide ; cette fixation semble varier suivant l'état des bactéries, proportionnelle à la concentration dans le milieu extérieur pour les resting cells, suivant un isotherme d'adsorption du type Langmuir pour les cellules en croissance.

La forte radioactivité retrouvée pour les cellules en croissance montre que la sulfanilamide a bien pénétré dans la cellule mais cela ne rend pas compte de la totalité de la sulfanilamide fixée par les bactéries ; les protéines retenant une partie de la radioactivité, il est nécessaire d'envisager l'hypothèse d'une fixation de la sulfanilamide sur la membrane bactérienne ou d'une intégration dans les molécules complexes, peut-être par suite de son analogie structurale avec d'autres métabolites (PAB). Cependant, nous pourrions constater avec Cooper, que les résultats obtenus sont décevants du fait qu'ils ne constituent qu'une approche du phénomène, ce qui nous engage à continuer nos travaux dans cette voie.

CHAPITRE V

RECHERCHE COMPARATIVE DE MODIFICATIONS APPARUES DANS LE MILIEU DE CULTURE DURANT LA CROISSANCE DE E. COLI SENSIBLE ET SULFAMIDORÉSISTANT

I - ETUDE DES VARIATIONS DE L'ACIDITE DU MILIEU DE CULTURE.

Nous avons étudié les variations de l'acidité développée dans le milieu de culture durant la croissance des souches E.coli N, E.coli SA 5 en milieu sulfamidé à 5 g/l et E.coli SA 10 en milieu sulfamidé à 10 g/l.

Les expériences ont été réalisées avec et sans aération de la culture.

A - ETUDE DES VARIATIONS DU pH.

Les mesures de pH sont réalisées au pHmètre Meci avec électrodes de verre et de calomel, à une température de 18°. L'appareil est vérifié avec des solutions tampons étalons, de pH 4 et 7.

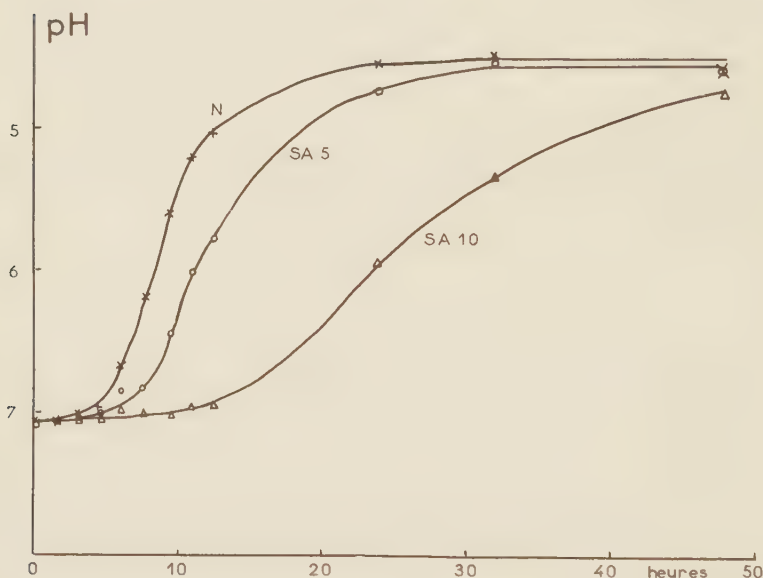
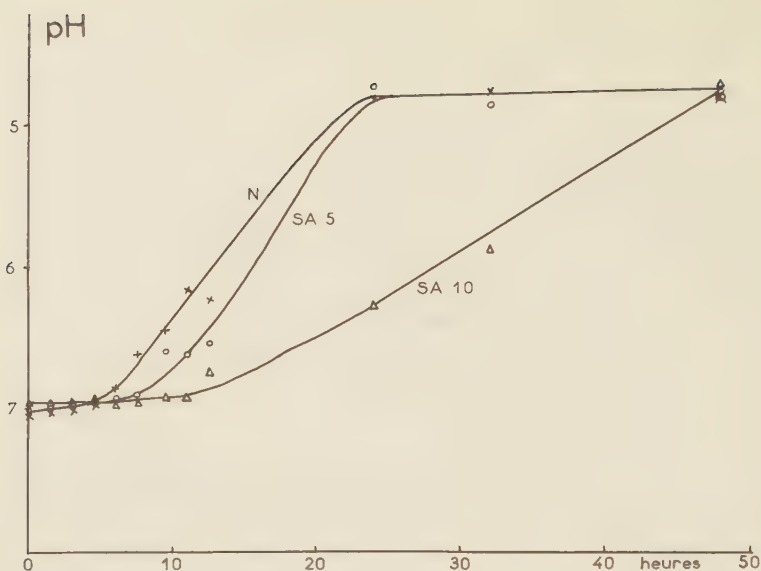
Le tableau n° 28 et les courbes n° 28 et 28 bis donnent les valeurs obtenues.

Tableau n° 28

Variations du pH mesurées durant la croissance.

Temps en heures et minutes.	Avec aération			Sans aération		
	N	SA 5	SA 10	N	SA 5	SA 10
0	7,05	6,98	7,00	7,05	7,08	7,06
1.30	7,02	7,00	7,00	7,05	7,06	7,05
3	7,00	6,98	6,98	7,00	7,03	7,04
4.30	6,98	6,96	6,96	6,92	7,00	7,01
6	6,85	6,92	6,95	6,68	6,85	6,98
7.30	6,62	6,92	6,96	6,20	6,84	7,00
9.30	6,46	6,60	6,92	5,60	6,45	7,00
11	6,28	6,60	6,92	5,22	6,02	6,96
12.30	6,18	6,55	6,75	5,05	5,80	6,95
24	4,85	4,75	6,30	4,55	4,75	5,96
32	4,85	4,90	5,90	4,50	4,55	5,35
48	4,85	4,85	4,76	4,55	4,60	4,78

En comparant ces graphiques à ceux qui indiquent la croissance dans cette même expérience (n° 21 et 21 bis), nous pouvons constater que les courbes présentent des allures identiques, l'acidification est parallèle à la



Graphique 28 et 28 bis - Variations du pH mesurées durant la croissance.
n° 28 : en milieu aéré - n° 28 bis : en milieu non aéré.

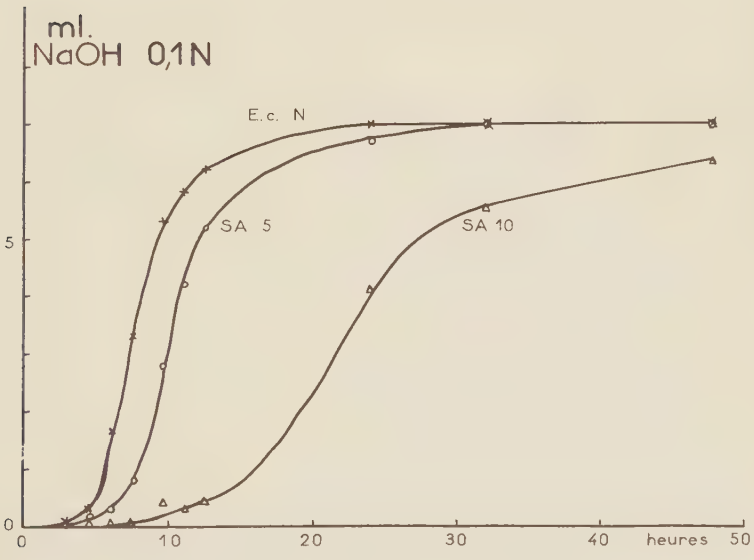
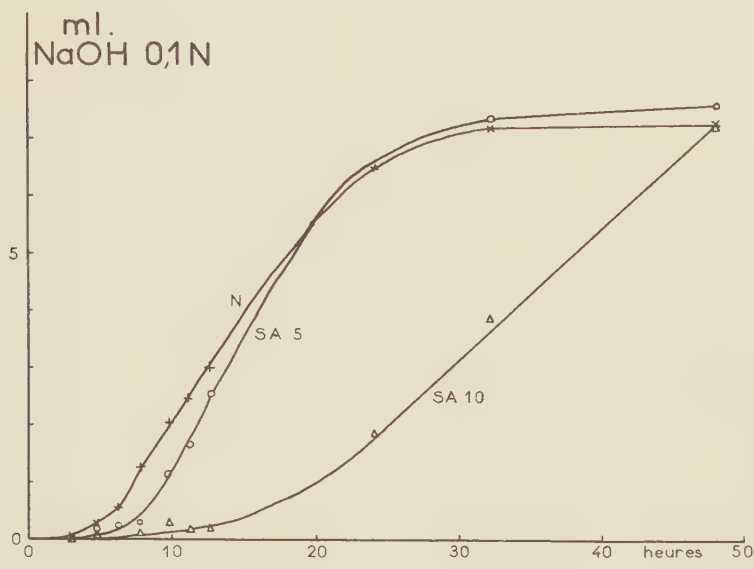
croissance ; *E. coli* N se développant plus rapidement que *E. coli* SA 5 et SA 10, le pH du milieu diminue plus rapidement. Nous constatons cependant que l'aération, qui favorise la croissance, diminue la vitesse d'acidification du milieu, sans doute en permettant la combustion de produits acides du métabolisme intermédiaire.

B - ETUDE DES VARIATIONS DE L'ACIDITE TITRABLE A LA PHENOL-PHTALEINE.

L'acidité produite durant la croissance bactérienne est dosée par NaOH 0,1 N en présence de 0,5 ml de phénolphthaléine à 2 % dans l'alcool. Nous

opérons sur une prise d'essai de 10 ml de culture ; du nombre obtenu, nous retranchons le volume de NaOH 0,1 N qu'il est nécessaire d'ajouter à 10 ml du milieu stérile pour obtenir le virage au rose de la phénolphtaléine, soit environ 2 ml.

L'expérience réalisée dans les mêmes conditions que la précédente nous a donné les résultats qui figurent au tableau n° 29 et aux graphiques n° 29 et 29 bis.



Graphiques 29 et 29 bis - Variations de l'acidité titrable à la phtaléine.
n° 29 : en milieu aéré - n° 29 bis : en milieu non aéré.

Tableau n° 29

Acidité libérée dans 10 ml de milieu de culture durant la croissance.

Valeurs exprimées en ml de NaOH 0,1 N.

Temps en heures et minutes.	Avec aération			Sans aération		
	N	SA 5	SA 10	N	SA 5	SA 10
0	2,2	2	2,1	1,8	1,8	1,9
3	0	0	0	0,1	0	0
4.30	0	0,2	0,1	0,3	0,2	0
6	0,6	0,3	0,3	1,7	0,3	0
7.30	1,3	0,3	0,2	3,3	0,8	0
9.30	2,1	1,2	0,3	5,3	2,8	0,4
11	2,5	1,7	0,2	5,8	4,2	0,3
12.30	3,0	2,6	0,2	6,2	5,2	0,4
24	6,5	8,0	1,9	7,0	6,7	4,1
32	7,2	7,4	3,9	7,0	7,0	5,5
48	7,3	7,7	7,3	7,0	7,0	6,4

Ces graphiques montrent des résultats analogues à ceux qui traduisent la variation du pH (n° 28 et 28 bis) et donc à ceux qui représentent la croissance (n° 21 et 21 bis) ; ils nous confirment que *E.coli* SA 5 présente un métabolisme très voisin de *E.coli* N alors que *E.coli* SA 10 produit une acidification plus lente mais qui arrive finalement à la même valeur que celle des autres souches.

Nous aurions pu penser que l'aération éliminait des acides volatils du milieu de culture ; le fait que l'acidité développée soit sensiblement la même, avec et sans aération, indique qu'il n'en est rien : l'aération ne fait que retarder l'acidification du milieu et permet une meilleure croissance.

II - ETUDE DE LA CONSOMMATION DU GLUCOSE DURANT LA CROISSANCE.

L'étude de la consommation du glucose par *E.coli* sensible à la sulfanilamide a été réalisée par Ehrwein (86) avec la souche même que nous utilisons et avec le même milieu de culture : cet auteur a montré que durant la première phase de la croissance, une quantité importante de glucose est consommée sans synthèse appréciable de matière vivante, ce qui implique un métabolisme actif dès l'inoculation des bactéries.

Nous avons mesuré la consommation de glucose durant la croissance de *E. coli* N :

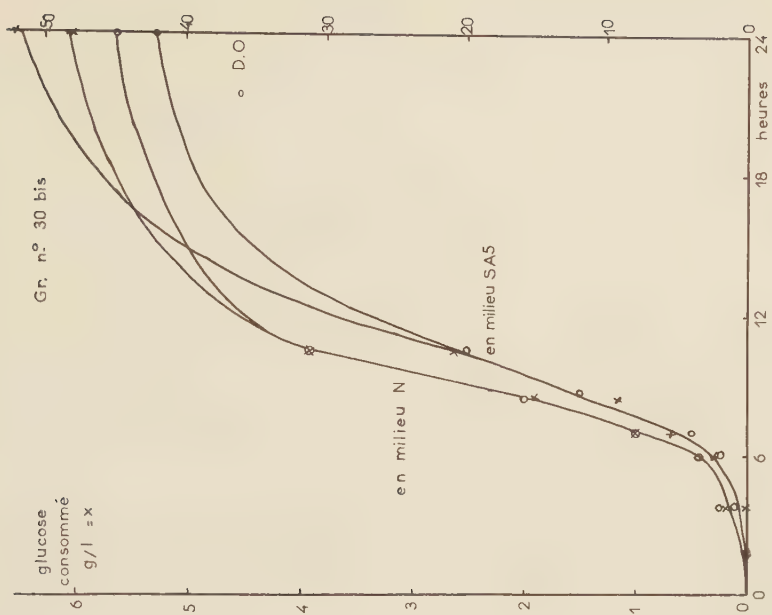
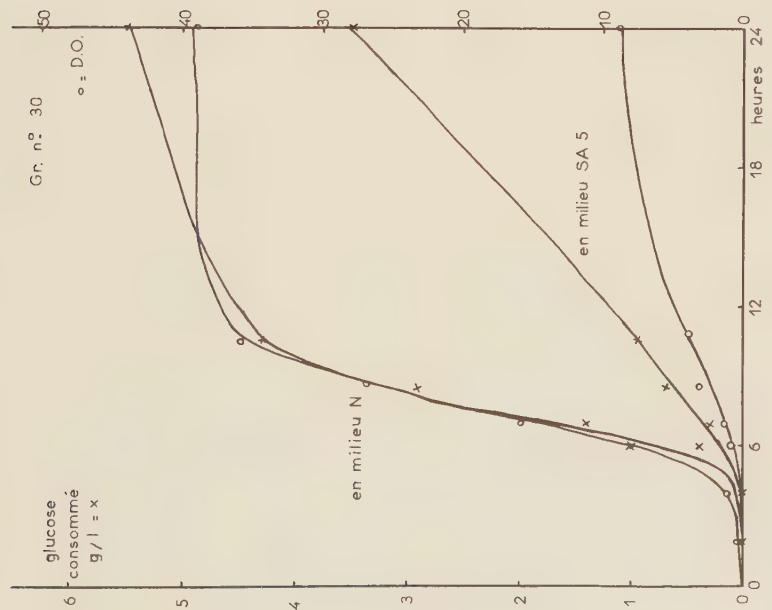
- en milieu normal
- en milieu sulfamidé à 5 g/l

et de *E.coli* SA 5 :

- en milieu normal
- en milieu sulfamidé à 5 g/l.

Etant donné la forte concentration du glucose dans notre milieu (10 g/l), nous avons utilisé la méthode classique de Bertrand en opérant sur une prise d'essai de 5 ml de milieu de culture centrifugé. Nous nous sommes assurés que la présence de sulfanilamide ne gênait pas le dosage.

Nous avons obtenu les résultats qui figurent au tableau n° 30 et graphiques n° 30 et 30 bis.



Graphiques 30 et 30 bis - Rapports entre croissance et consommation du glucose.
n° 30 ; E. coli N - n° 30 bis ; E. coli SA 5.

Tableau n° 30

Rapports entre croissance et consommation du glucose chez
E.coli N, et SA 5.

Souches Concentration SA g/l	E.coli N				E.coli SA 5			
	0		5		0		5	
Temps en heures et minutes	Glucose consommé g/l	D.O	Glucose consommé g/l	D.O	Glucose consommé g/l	D.O	Glucose consommé g/l	D.O
2	0	0,5	0	0	0	0	0	0
4	0	1	0	0	0,20	2	0	1
6	1	8	0,40	1	0,30	3	0,30	2
7	1,40	16	0,30	1,5	1	8	0,70	4
8,30	2,90	27	0,70	3	1,90	16	1,15	12
10,30	4,30	36	0,95	4	3,90	31	2,60	20
24	5,50	39	3,75	9	6	45	6,50	42

Les graphiques n° 30 et 30 bis nous montrent qu'en milieu sulfamidé à 5 g/l, E.coli N voit sa croissance fortement inhibée, alors que les bactéries consomment du glucose ; le rendement de croissance est donc très diminué. Nous constatons d'autre part que les courbes représentant la consommation en glucose et la croissance de E.coli N en milieu N et E.coli SA 5 en milieu N et SA 5 sont très semblables ; E.coli SA 5 présente donc un métabolisme voisin de celui de E.coli N. Quand la phase logarithmique de la croissance est terminée, la D.O augmente encore très lentement alors que la consommation en glucose se poursuit d'une façon assez intense. Lorsque la croissance s'arrête, le milieu renferme encore 4 à 5 g/l de glucose ; ce n'est donc pas le manque d'aliment carboné qui est cause de l'arrêt de la croissance.

Nous avons étudié la consommation du glucose en fonction de la croissance et de l'aération du milieu, résultats rapportés dans les tableaux n° 31 et 32.

Nous constatons que l'aération de la culture entraîne une consommation plus importante du glucose et une meilleure croissance ; cependant si nous calculons le rendement de la croissance par le rapport $\frac{\text{densité optique}}{\text{glucose consommé}}$ nous trouvons une valeur moyenne de 7 en milieu non aéré ($\frac{35}{5}$) et de 8 ($\frac{64}{8}$) en milieu aéré, deux valeurs assez voisines : il semble donc que l'aération ne modifie pas le métabolisme bactérien, mais seulement son rythme.

Nous constatons également que E.coli N placé en milieu sulfamidé à 2,5 g/l consomme du glucose avec un rendement de croissance très faible ; il semble donc qu'il y ait gaspillage d'énergie, le glucose pouvant être métabolisé en un produit dont l'utilisation ultérieure est bloquée par la présence de la sulfanilamide ; les bactéries résistantes seraient capables d'utiliser ce produit intermédiaire avec un bon rendement pour E.coli SA 5, mais beaucoup plus faible pour E.coli SA 10 ainsi qu'il ressort des tableaux.

Ces résultats nous permettent de conclure que le métabolisme du glucose est très voisin chez E.coli sensible et résistant à la sulfanilamide.

Tableau n° 31

Consommation du glucose et croissance en milieu non aéré (GC).

Souche	Concentration du milieu en SA g/l	Temps en heures et minutes									
		2		4		7.30		9.30		11.30	
		GC	D.O	GC	D.O	GC	D.O	GC	D.O	GC	D.O
N	0	0,55	0		1,5	2,15	25,5	3,85	31,5	4,70	32,5
N	2,5	0,30	0	1,45	1	1,60	4	2,15	6	2,30	6
SA 5	0		1	1,45	4	3,00	31	4,00	32,5	4,45	33
SA 5	5	-	1	0,15	1	0,30	7,5	2,30	19	3,45	33
SA 10	0	0,15	1	1,85	2,5	2,15	23	3,15	32	4,55	33
SA 10	10	-	0	-	0	0,15	0,2	-	0,5	0,40	1
										4	14,5
										4,55	33
										4,00	8
										4,80	33
										4,45	37
										5,05	38
										5,05	41
										4,60	17

Tableau n° 32

Consommation du glucose et croissance en milieu aéré (GC).

Souche	Concentration du milieu en SA g/l	Temps en heures et minutes									
		2		4		7.30		9.30		11.30	
		GC	D.O	GC	D.O	GC	D.O	GC	D.O	GC	D.O
N	0	0,20	2	0,60	4	1,85	35	3,85	62	5,30	67
N	2,5	1,45	1	1,90	2	2,20	4	2,45	5,5	2,95	7
SA 5	0	0,65	1	1,00	6	2,75	50	5,30	58	6,05	61
SA 5	5	1,45	2	1,40	2,5	2,65	7,7	3,15	21	3,65	53
SA 10	0	0,75	1,5	1,35	7	2,90	51	4,35	61	5,35	65
SA 10	10	0,55	1,5	1,30	2	1,85	3	2,20	4	2,70	6
										8,75	74
										7,35	54
										8,35	66
										7,75	65
										8,05	70
										7,35	28

III - COMPARAISON DE CERTAINS BESOINS NUTRITIFS DE E.COLI SENSIBLE ET RESISTANT A LA SULFANILAMIDE : SOUFRE ET AZOTE.

Il nous a semblé intéressant d'étudier les besoins en soufre de E.coli résistant à la sulfanilamide : en effet, un acide aminé soufré, la méthionine, étant doué de propriétés antisulfamides (119) on pouvait penser que la sulfamidorésistance serait due à une synthèse accrue de méthionine, ce qui se traduirait par des besoins en soufre plus importants.

Le métabolisme du soufre chez E.coli a été étudié par Roberts et coll (245) qui ont montré que 95 % du soufre assimilé se trouve sous forme de cystéine et méthionine ; la méthionine est en totalité dans les protéines, alors que la cystéine est partagée également entre protéines et glutathion.

Cowie et coll (60) ont montré que lorsque le milieu de culture renferme plus de 10 $\mu\text{g/ml}$ de soufre sous forme de sulfate, la croissance de E.coli est normale et ne dépend pas de la concentration en soufre. En dessous de cette concentration, les bactéries consomment tout le soufre du milieu puis la croissance s'arrête.

Dans un milieu ne contenant pas de soufre, la faible croissance observée, présente deux phases :

a) Une phase initiale durant laquelle les cellules utilisent les traces de soufre dues aux impuretés du milieu et les réserves de glutathion dans les bactéries lors de leur inoculation.

b) Après épuisement de ces deux sources, les bactéries continuent à croître durant quelques heures, mais à un taux très faible ; elles utilisent alors une seconde réserve de soufre fournie par une partie des protéines alcool-solubles (Roberts et coll, 245.). Cette réserve épuisée, la croissance cesse complètement.

Ces travaux montrent donc l'absolue nécessité du soufre pour assurer la croissance de E.coli.

Roberts et coll (245) ont également cherché quelles étaient les meilleures sources de soufre pour E.coli et ils ont montré, en utilisant une méthode de compétition isotopique, que l'hyposulfite, le sulfite, le sulfate, la cystine, la lanthionine, la méthylcystéine, étaient utilisées préférentiellement au sulfate et pouvaient servir comme seule source de soufre.

Le glutathion est également utilisable, mais au delà de 15 $\mu\text{g/ml}$, il devient inhibiteur de la croissance.

D'autres composés, taurine, acide cystéique, homocystéine, méthionine sont utilisables par les bactéries mais avec un rendement plus faible. La cystéine par contre ne serait pas utilisée.

A - ETUDE DES EFFETS DE LA CARENCE EN SOUFRE.

Nous avons cultivé nos trois souches sur des milieux carencés en soufre ; pour cela nous avons remplacé le sulfate d'ammonium et le sulfate de magnésium de notre milieu habituel par des quantités équivalentes de chlorures.

Nous avons vérifié l'absence de soufre, sous forme de sulfate, dans le milieu ainsi préparé, par addition d'une solution de chlorure de baryum en milieu chlorhydrique ; nous n'obtenons pas de précipité (la réaction permet de déceler facilement 5 $\mu\text{g/ml}$ de soufre sous forme de sulfate). Le milieu normal habituel renferme 1400 μg de soufre par ml.

Il est nécessaire de laver soigneusement les bactéries qui serviront d'inoculat pour ne pas introduire de soufre dans le milieu de culture : ce lavage est effectué deux fois, avec une solution stérile de chlorure de sodium à 8,5 g/l puis les bactéries sont inoculées de façon standardisée en milieu synthétique glucosé additionné de quantités décroissantes de soufre sous forme de sulfate de sodium.

Les tableaux n° 33 - 34 - 35 rendent compte des résultats obtenus.

Tableau n° 33

Croissance (D.O) de E.coli N en milieu carencé en soufre.

Temps en heures	Concentration en soufre ($\mu\text{g/ml}$)				
	1 400 (témoin)	14	1,4	0,14	0
6	10	10	10	9	6
21	37	34	29	9	6
30	42	41	34	10	6
45	45	42	35	11	6
54	46	42	38	12	6

Tableau n° 34

Croissance (D.O) de E.coli SA 5 en milieu carencé en soufre.

Temps en heures	Concentration en soufre ($\mu\text{g/ml}$)				
	1 400 (témoin)	14	1,4	0,14	0
a) <u>En milieu non sulfamidé</u>					
6	10	9	9	5	4
21	35	34	23	5	4
30	41	39	27	5	4
45	45	41	28	6	4
54	46	42	29	6	4
b) <u>En milieu sulfamidé à 5 g/l</u>					
6	2	3	2	1	2
21	35	30	24	6	5
30	41	35	25	6	6
45	46	40	31	6	6
54	47	41	32	6	6

Tableau n° 35

Croissance (D.O.) de *E.coli* SA 10 en milieu carencé en soufre.

Temps en heures	Concentration en soufre ($\mu\text{g/ml}$)				
	1 400 (témoin)	14	1,4	0,14	0
a) Milieu non sulfamidé.					
6	10	10	11	6	6
21	33	32	25	6	6
30	37	36	28	7	6
45	39	36	30	7	6
54	40	38	30	7	6
b) Milieu sulfamidé à 10 g/l.					
6	1	1	1	1	1
21	19	28	22	6	6
30	22	28	25	6	6
45	30	38	30	6	6
54	33	38	32	6	6

Nous constatons que *E.coli* N en milieu non sulfamidé, *E.coli* SA 5 et SA 10 en milieu sulfamidé ou non, se comportent de la même façon ; il faut atteindre une concentration 1 000 fois plus faible que la normale pour que la croissance diminue sensiblement ; avec une concentration 10 000 fois plus faible la croissance est très réduite. Cependant, même en l'absence de soufre, nous notons une très légère croissance qui s'arrête dès que sont épuisées les réserves utilisables de l'inoculat, ce qui se produit plus rapidement quand la culture est réalisée en absence de sulfanilamide.

On aurait pu penser que, tout au moins chez les souches résistantes, le soufre de la sulfanilamide pourrait être utilisé ; il n'en est rien et même contrairement à notre hypothèse, les souches résistantes n'ont pas besoin de plus de soufre pour synthétiser éventuellement plus de méthionine puisque leur croissance en présence de sulfanilamide est du même ordre que celle de la souche sensible. Dans le même ordre d'idées, nous nous sommes demandé si la carence en soufre ne rend pas *E.coli* N plus sensible à l'action de la sulfanilamide.

Les résultats sont rapportés dans le tableau n° 36.

Nous constatons que la présence de sulfamide dans le milieu de culture ne rend pas *E.coli* N plus sensible à la carence en soufre. Les croissances observées avec les concentrations en soufre (en sulfate) de 1/250 et 1/500 de la concentration normale (56 et 28 $\mu\text{g/ml}$) sont du même ordre que celles observées pour la souche *E.coli* N en milieu normal, sulfamidé aux mêmes doses (tableau n° 5).

Ces faits nous permettent de conclure que la synthèse accrue d'acides aminés soufrés, en particulier la méthionine, ne semble pas nécessaire pour permettre à *E.coli* de devenir sulfamido résistant.

B - ETUDE COMPARATIVE DE L'UTILISATION DE DIFFERENTES SOURCES DE SOUFRE.

Nous avons cultivé les deux souches *E.coli* N et SA 5 en présence de différentes sources de soufre : méthionine, cystéine, glutathion, sulfite, hy-

posulfite, sulfate ; les concentrations ont été calculées pour réaliser des teneurs en soufre de 2,5 - 5 - 10 - 20 µg/ml.

Les inoculats standards ont été obtenus à partir de cultures des deux souches, en milieu ne contenant que 5 µg de soufre (sulfate) par ml ; après le sixième passage, l'inoculum n'apporte qu'une quantité négligeable de sulfate.

Tableau n° 36

Etude de la croissance (D.O) de E.coli N en milieu carencé en soufre, en présence de sulfanilamide.

Teneur du milieu		Valeur de la D.O aux temps suivants			
Soufre µg/ml	SA g/l	8,30 h	24 h	32.30 h	48 h
56	0,125	4	33	34	39
28		5	33	35	39
14		5	21	22	24
7		5	13	13	13
3,5		5	19	9	9
0		4	4	4	4
56	0,250	4	27	27	32
28		3	25	25	27
14		3	21	22	22
7		4	11	11	11
3,5		3	5	6	7
0		4	4	4	4
56	0,500	3	17	18	20
28		3	17	18	20
14		3	14	15	17
7		3	7	7	7
3,5		3	5	5	6
0		3	3	3	3
56	1,000	3	9	9	10
28		3	9	9	11
14		3	9	9	10
7		3	7	7	7
3,5		3	5	5	5
0		3	3	3	3

La souche E.coli SA 5 estensemencée en milieu sulfamidé à 5 g/l.

Le tableau n° 37 donne les résultats de ces expériences.

Nous constatons que toutes les sources de soufre essayées sont utilisées par E.coli, sensible ou résistant à la sulfanilamide ; le glutathion cependant ne permet pas une croissance très forte ; Roberts et coll (245) ont obtenu des résultats du même ordre et pensent que le glutathion fourni peut se trouver sous la forme oxydée (GS-SG) non utilisable, ou alors que la fraction de S transformée par la cellule en déchets métaboliques est plus grande avec le glutathion qu'avec le sulfate.

Cystéine et méthionine sont utilisées par les deux souches mais, dans le cas de la méthionine, nous constatons que la croissance n'atteint pas son maximum.

Tableau n° 37

Croissance (D.O) de E.coli N et SA 5 en présence de différentes sources de soufre.

E.coli N					E.coli SA 5 sur SA 5 g/l			
Temps en heures				Source de S μg/ml	Temps en heures			
5	9	24	48		5	9	24	48
				<u>Méthionine</u>				
14	18	15	18	2,5	0	3	13	13
16	20	20	24	5	0	2	20	26
17	20	20	25	10	0	2	20	26
18	20	20	25	20	0	2	22	30
				<u>Cystéine</u>				
14	23	26	28	2,5	0	0	24	29
15	28	34	35	5	0	0	20	36
16	30	36	39	10	0	0	20	39
20	30	36	43	20	0	0	14	40
				<u>Glutathion</u>				
4	5	5	5	2,5	0	4	7	7
5	6	8	8	5	1	4	9	9
6	8	11	12	10	0	3	11	12
7	11	14	15	20	0	1	14	16
				<u>Sulfite</u>				
8	24	24	27	2,5	1	10	30	35
10	28	30	35	5	1	12	29	39
12	28	34	36	10	1	12	29	36
14	27	32	35	20	0	5	27	39
				<u>Hyposulfite</u>				
12	25	26	30	2,5	2	14	27	35
12	27	31	34	5	2	17	30	40
16	32	34	42	10	3	16	30	40
21	32	37	42	20	2	17	29	42
				<u>Sulfate</u>				
7	25	26	31	2,5	1	6	25	31
8	26	27	31	5	2	6	25	34
8	26	27	31	10	1	6	27	34
7	27	28	35	20	1	5	27	36
				Pas de soufre				
3	3	3	3	N SA 5	2	5	5	5
15	36	43	46		1	5	40	48

La croissance de la souche E.coli SA 5 est moins rapide que celle de la souche normale, mais elle atteint finalement des valeurs aussi élevées.

En conclusion, nous constatons que E.coli devenu résistant à la sulfanilamide possède les mêmes besoins en soufre que la souche sensible ; il ne peut utiliser le soufre de la molécule de sulfanilamide pour ses propres synthèses, la résistance ne provient donc pas d'une possibilité de destruction de la molécule suivie d'une utilisation du soufre. Du fait que les besoins en soufre sont les mêmes pour les deux souches, il ne semble pas qu'une synthèse accrue de méthionine soit nécessaire pour conférer la sulfamidorésistance à E.coli.

C - ETUDE DES BESOINS EN AZOTE.

Sartory et coll (254-255) montrèrent que *E.coli* est capable d'utiliser l'azote du milieu fourni par des acides aminés (milieu peptoné) ou par des sels d'ammonium, avec un rendement de croissance identique et constatèrent qu'il existe un rapport direct entre la quantité d'azote assimilé et la masse bactérienne récoltée. Virtanen et De Ley (301) puis De Ley (69), étudiant l'activité enzymatique des cellules bactériennes en fonction de la teneur du milieu en azote, montrèrent que les protéines cellulaires restent sensiblement constantes si le milieu renferme plus de 40 mg/l d'azote ; quand cette teneur s'abaisse, les enzymes adaptatifs voient leur activité très diminuée cependant que les enzymes respiratoires, nécessaires à la vie cellulaire, sont beaucoup moins altérés.

L'azote s'avère donc indispensable à la croissance bactérienne et nous avons étudié les effets de sa carence chez *E.coli* sensible et sulfamidorésistant, dans le but de chercher si l'acquisition de cette résistance se traduit par une perturbation métabolique entraînant des besoins plus élevés en azote, par exemple pour effectuer une synthèse accrue de certains acides aminés.

Le milieu utilisé habituellement dans nos expériences renferme 1 g d'azote par litre, sous forme de sulfate d'ammonium ; nous avons réalisé nos expériences en présence de différents teneurs en azote, en maintenant constante la concentration du milieu en sulfate.

Les bactéries sont soigneusement lavées avant leur inoculation, pour éviter l'introduction de sels d'ammonium venant de la culture.

Le tableau n° 38 rassemble les résultats obtenus.

Tableau n° 38

Croissance (D.O) de *E.coli* N en milieu carencé en azote.

Temps en heures et minutes	1 000 (témoin)	Concentration en azote (µg/ml)				
		40	20	10	5	0
6.30	21	3	3	1	0,5	0,5
19	37	17	10	5	1	0,5
31	43	17	10	5	1,5	0,5
47	45	17	10	5	1,5	0,5

Croissance (D.O) de *E.coli* SA 5 en milieu carencé en azote.

Temps en heures et minutes.	Concentration en azote (µg/ml)					
	1 000 (témoin)	40	20	10	5	0
a) Milieu non sulfamidé						
6.30	10,5	7	8	4	1	0,5
19	34	15	8	4	2	0,5
31	44	15	8	4	2	0,5
47	44	18	8	4	2	0,5
70	-	18	8	4	2	0,5
b) Milieu sulfamidé à 5 g/l.						
6.30	3	2	2	2	1	0,5
19	33	17	9	4	2	0,5
31	40	17	9	4	2	0,5
47	42	17	9	4	2	0,5
70	-	17	9	4	2	0,5

Nous constatons que la carence en azote retentit très rapidement sur la croissance puisque une concentration de $40 \mu\text{g/ml}$, soit $1/25$ de la normale inhibe la croissance qui n'atteint qu'à peine 40 % de la normale.

Les croissances de la souche adaptée, cultivée en milieu sulfamidé ou non sulfamidé, sont les mêmes que celles de la souche sensible si les concentrations en N sont identiques, ce qui permet de conclure que la résistance à la sulfanilamide ne s'accompagne pas d'une augmentation des besoins azotés et que la souche résistante n'utilise pas l'azote de la molécule de sulfanilamide.

IV - RECHERCHE D'ANTISULFAMIDES DANS LES MILIEUX DE CULTURE DE E.COLI.

Dès la mise en évidence, par Woods et Fildes des propriétés antisulfamides de l'acide para-aminobenzoïque (PAB) de nombreux auteurs (207-164-214-172) ont pensé que la sulfamidorésistance des bactéries pourrait être attribuable à une synthèse accrue de PAB ; cette hypothèse, si elle a pu être vérifiée dans quelques cas (214-172), ne semble pas assez généralement confirmée pour emporter la conviction et nous avons voulu apporter notre contribution à l'étude de ce problème.

Nous avons donc cherché si notre souche de E.coli rendue résistante à 5 et 10 g/l de sulfanilamide synthétisait plus de PAB que E.coli N. Nous nous sommes limités à évaluer le PAB éventuellement libéré dans le milieu de culture par E.coli N et SA 5 au cours de leur croissance ; il est cependant possible que du PAB synthétisé échappe à nos dosages, soit qu'il entre dans un complexe tel que l'acide folique, difficilement accessible à l'analyse, soit qu'il ne diffuse pas à l'extérieur de la cellule ; son dosage intracellulaire s'est révélé impossible par la technique que nous avons utilisée, la destruction des cellules libérant des substances gênantes.

Les dosages par voie chimique étant très difficiles à réaliser avec de petites quantités de PAB que nous pensons devoir trouver, nous avons employé une méthode microbiologique.

Nous nous sommes procuré un mutant de E.coli PAB (-) (1) incapable de synthétiser le PAB nécessaire à sa croissance et dépendant donc du PAB qui lui est fourni dans le milieu de culture : cet organisme est extrêmement sensible et une quantité de $1 \mu\text{g}$ de PAB par litre de milieu suffit à assurer une croissance optima.

Cette sensibilité nécessite des précautions expérimentales ; en particulier, la verrerie utilisée doit être soigneusement lavée au mélange sulfochromique puis abondamment rincée à l'eau distillée. Chaque série d'expériences doit être effectuée en double ou même en triple exemplaires ; la souche doit être testée chaque fois afin de dépister une contamination accidentelle.

Le mutant E.coli PAB (-) croît dans notre milieu synthétique glucosé après addition de PAB et la mesure de la densité optique de la culture permet d'évaluer la concentration en PAB ainsi que le montre le tableau n° 39.

(1) Le mutant nous a été fourni par l'American Type Collection et porte le numéro 9723 a.

Tableau n° 39

Croissance (D.O.) du mutant E.coli PAB (-) en présence de PAB.

Temps en heures	Concentration en PAB en $\mu\text{g/l}$				
	0	0,5	1	3	5
8	0	1	4	14	18
24	0	9	14	20	30
47	0,5	9	14	30	30

Le dosage du PAB dans les milieux de culture s'effectue en tenant compte des remarques suivantes, mises en évidence par des essais préliminaires.

1) La présence de sulfanilamide, même à l'état de trace, inhiberait la croissance de E.coli PAB (-) ; il est donc nécessaire que les inoculats de E.coli dont on veut mesurer le pouvoir de synthétiser PAB durant leur croissance, n'apportent pas de sulfanilamide ; aussi cultivons nous nos souches E.coli SA 5 et E.coli SA 10 en milieu non sulfamidé durant 3 passages pour éliminer toute trace de sulfanilamide qui serait apportée avec l'inoculat ou par les bactéries elles-mêmes. Nous avons vérifié que ces souches conservent leur résistance à la sulfanilamide.

2) Nous nous sommes aperçus que notre inoculat standard (0,2 ml d'une culture de densité optique 20 pour 10 ml de milieu) pouvait amener une croissance tardive du mutant PAB (-), même en absence de PAB ; on peut supposer qu'il s'est produit une lyse d'une partie des bactéries qui libèrent dans le milieu de culture des purines qui peuvent remplacer PAB comme facteur de croissance pour le mutant. Il est nécessaire de réaliser un inoculat très faible du mutant PAB (-).

Nous avons donc utilisé un inoculat obtenu par dilution au 1/5 000 000 d'une culture âgée de 30 heures (présentant une D.O de 15) du mutant PAB (-) sur culture synthétique contenant $1\mu\text{g/l}$ de PAB.

Une numération effectuée sur plaque de gélose nous indique que l'inoculat ainsi réalisé renferme environ cinq bactéries.

Les trois souches E.coli N, SA 5, SA 10 sont cultivées sur 50 ml de milieu normal durant 24 heures. Les cultures sont centrifugées pour éliminer la plus grande partie des bactéries puis filtrées sur bougies Chamberland L3 stériles. La stérilité des filtrats obtenus est vérifiée par séjour à l'étuve durant 24 heures.

Ces filtrats sont alors répartis à différentes doses dans des tubes de cultures, puis complétés à 10 ml avec du milieu normal comme il est indiqué dans le tableau n° 40.

Après croissance, les cultures sont vérifiées en milieu sans PAB pour être certain que la croissance observée est bien due au mutant PAB (-).

L'étude du tableau nous montre que pour E. coli N 0,4 ml de filtrat ajoutés au tube de culture réalisent une concentration d'environ $1\mu\text{g/l}$ de PAB, soit une concentration de $25\mu\text{g}$ par litre de filtrat de culture. Les filtrats des cultures SA 5 et SA 10 apportent des quantités légèrement plus faibles, mais du même ordre.

Il nous semble donc difficile d'interpréter la sulfamidorésistance de nos souches SA 5 et SA 10 par une synthèse accrue de PAB, la quantité de PAB

libérée dans le milieu étant du même ordre que celle qui est libérée par E.coli N.

Tableau n° 40

Croissance (D.O) de E.coli PAB (-) en présence de filtrats de cultures.

Temps de culture en heures			ml de filtrat de culture ajoutés à 10 ml de milieu.	
24	39	65		
1	23	31	1	Filtrat de E.coli N
0	16	20	0,4	
0	11	12	0,2	
0	0	6	0,1	
1	21	28	1	Filtrat de E.coli SA 5
0	14	16	0,4	
0	2	10	0,2	
0	1	6	0,1	
1	19	23	1	Filtrat de E.coli SA 10
0	13	13	0,4	
0	7	9	0,2	
0	0	5	0,1	

Etalonnage réalisé avec E.coli PAB (-).

0	0	0	0	PAB µg/l.
0	1	8	0,5	
1	17	19	1	

Cette faible quantité de PAB libéré rend cependant compte de légères propriétés antisulfamides du milieu de culture, que nous avons mises en évidence par les expériences suivantes :

Une culture de E.coli N en milieu non sulfamidé, ayant atteint sa phase stationnaire, est centrifugée en tube stérile et le milieu recueilli.

Les six fioles du biophotomètre sont préparées de la façon suivante :

Fiole n°	1	2	3	4	5	6
ml de milieu SA 5 g/l	10	10	10	10	10	10
ml, centrifugat de culture de E.coli N	0	0,2	0	0,2	0	0,2
Inoculat avec E.coli SA 5	In. st	In. st	$\frac{\text{In. st}}{10}$	$\frac{\text{In. st}}{10}$	$\frac{\text{In. st}}{100}$	$\frac{\text{In. st}}{100}$

La croissance dans toutes ces fioles est enregistrée au biophotomètre. Les valeurs exprimées correspondent aux données de l'appareil transformées en D.O selon Hawk et coll (122).

Les résultats, rassemblés dans le tableau n° 41 nous montrent que l'addition de 0,2 ml de centrifugat de culture de E.coli N favorisent d'autant plus la croissance que l'inoculat est plus faible.

Tableau n° 41

Croissance (D.O) de *E.coli* SA 5 en milieu sulfamidé à 5 g/l, avec et sans addition de centrifugat de culture de *E.coli* N.

Temps en heures	Fioles					
	1	2	3	4	5	6
2	0,9	0,9				
4	1,8	1,8				
6	3,6	3,6				
8	6,6	6,6				
10	13,1	13,1		1,3		
12	23	23		1,8		
14	50	50		2,7		
16	92	92	1,8	4,1		1,3
18	140	140	2,7	6,6		1,8
20	170	170	4	11,4		2,05
22	-	-	6,6	21,5		3,6
24	-	-	11	45,6		5,6
26	-	-	21,5	86		9,2
28	-	-	44,5	140	0,4	16,8
30	-	-	85	170	0,9	33,7
32	-	-	180	-	2,2	70
34	-	-	170	-	4,6	150
36					9,7	
38					15,5	
40					26	
42					48	
44					82	
46					115	
48					140	

Pour un inoculat standard (fioles 1 et 2), les deux croissances sont identiques ; pour un inoculat 10 fois plus faible (fioles 3 et 4 nous constatons que la croissance est plus rapide dans la fiole 4 additionnée du centrifugat ; cette différence est encore plus accentuée dans les fioles 5 et 6.

Pour rendre compte de ces résultats, nous pouvons supposer que les 0,2 ml de centrifugat ajoutés renferment une certaine quantité de produits à action antisulfamide, et plus l'inoculat est faible, plus les bactéries qui le composent trouveront de molécules indispensables à leur disposition, ce qui leur permet une croissance plus rapide que les témoins cultivés en l'absence de centrifugat.

Une expérience identique réalisée en ajoutant dans les fioles n° 2-4-6, 0,2 ml de centrifugat de culture de *E.coli* SA 5 faite en milieu sulfamidé à 5 g/l, nous donne les résultats rapportés dans le tableau n° 42.

L'effet du centrifugat d'une culture de *E.coli* SA 5 est du même ordre que dans l'expérience précédente (centrifugat de culture de *E.coli* N).

En conclusion, il est peu vraisemblable que le milieu de culture de *E.coli* SA 5 contienne plus d'antisulfamides que le milieu de culture de *E.coli* N, donc que la résistance à la sulfanilamide soit due à une augmentation de la production par les bactéries résistantes de substances douées d'activité anti-sulfamide.

Tableau n° 42

Croissance (D.O) de E.coli SA 5 en milieu sulfamidé à 5 g/l, avec et sans addition de centrifugat de culture de E.coli SA 5.

Temps en heures.	Fioles					
	1	2	3	4	5	6
2	2,7	3,6				
4	7,6	8,6				
6	15,5	18,5	2,6	3,2		
8	35	38	3,2	4,6		
10	85	84	4,6	7,6		3,2
12	150	140	7,6	14,3		4,6
14			15,5	32		6,6
16			30	85		12
18			66	152	2,7	24
20			130		3,4	60
22			170		4	122
24					5,6	170
26					7,6	
28					12	
30					21	
32					45	
34					109	
36					170	

CHAPITRE VI

RECHERCHE DE MODIFICATIONS APPARUES CHEZ E. COLI SULFAMIDORÉSISTANT

L'étude que nous avons présentée dans le précédent chapitre, de quelques métabolismes de E.coli sensible et résistant à la sulfanilamide ne nous ayant pas permis de mettre en évidence des différences susceptibles d'expliquer la sulfamidorésistance, nous avons dirigé nos recherches dans une autre voie, celle des protéines et des acides nucléiques, deux constituants essentiels de tous les organismes.

I - ETUDE DES ACIDES AMINÉS DES PROTÉINES DE E.COLI SENSIBLE ET RÉSISTANT À LA SULFANILAMIDE.

La croissance des microorganismes dépend de leur capacité à synthétiser certains constituants à partir des matériaux offerts dans le milieu de culture.

Les protéines étant un de ces constituants essentiels, il nous a semblé utile de comparer la composition des protéines de E.coli sensible et devenu sulfamidorésistant pensant que l'acquisition de la résistance pourrait aller de pair avec une modification des protéines de la bactérie.

L'étude des acides aminés bactériens a fait l'objet de nombreux travaux ; Stokes et Gunness (281), utilisant des méthodes microbiologiques, déterminèrent les acides aminés de nombreux microorganismes ; mais ces méthodes longues et délicates furent rapidement abandonnées quand la chromatographie sur papier fut codifiée par Dent (72) ; cette nouvelle technique fut aussitôt appliquée à l'étude des acides aminés des bactéries (97-240-322-25-150-129-244-5-186).

L'étude comparative de souches sensibles et résistantes à différentes drogues a été également réalisée : Bolle (31) constate l'absence d'acide glutamique dans une souche de Staphylococcus aureus résistante à la pénicilline. Reif (243) ne décèle pas de différences sensibles entre des souches de Mycobacterium sensibles et résistantes à l'isoniazide. Banerjea (11) comparant des types S et R de E.coli montre que le type R, correspondant à la perte d'un antigène somatique O, est caractérisé par une teneur plus faible en lysine, histidine, valine et phénylalanine alors que l'acide aspartique se trouve à un taux plus élevé.

Au lieu d'étudier les acides aminés des bactéries, on peut se proposer de caractériser et de doser les acides aminés libérés dans le milieu de culture ; ainsi Goldfarb (107) montre que chez Staphylococcus aureus, l'alanine cesse graduellement d'apparaître dans le milieu de culture au fur et à mesure que se développe la résistance à la pénicilline, alors que valine et glycocolle apparaissent, révélant ainsi les perturbations du métabolisme des acides ami-

nés sous l'influence de l'antibiotique. D'autres auteurs ont suivi l'apparition ou la disparition d'acides aminés dans le milieu de culture (240-315-62-64-193-17) mais cette étude est rendue difficile par la présence des sels minéraux dans le milieu.

Nous avons étudié les acides aminés des protéines de nos trois souches E.coli N, SA 5 et SA 10 cultivées sur leurs milieux respectifs. Les protéines sont obtenues en traitant les bactéries selon une technique dérivée de la méthode de Schneider (258) permettant d'éliminer toutes les substances bactériennes non protéiques (245).

TECHNIQUES UTILISEES.

a) Extraction des protéines.

Nous pratiquons l'extraction sur les bactéries venant d'une culture de 50 ml, récoltées par centrifugation à basse température, lavées 3 fois avec une solution froide contenant 8,5 g de chlorure de sodium et 1 g de citrate de sodium par litre. Nous remettons le culot en suspension dans 20 ml d'acide trichloracétique (ATC) à 10 % froid et nous laissons en contact au moins 2 heures.

La solution recueillie par centrifugation nous donne la fraction acidosoluble. Nous lavons le culot deux fois avec 10 ml d'ATC à 1 % froid puis les liquides sont rejetés.

Nous traitons le culot par 10 ml d'éthanol à 75 % durant 30 minutes à 45° et par centrifugation nous recueillons la fraction acidosoluble. Nous traitons ensuite le culot par 10 ml d'un mélange à parties égales d'éthanol et éther durant 30 minutes à 45° et nous recueillons ainsi la fraction éthéro-alcoolique.

Nous traitons ensuite le culot bactérien, à deux reprises, par 10 ml d'ATC à 5 %, durant 20 minutes au bain-marie bouillant, pour extraire les acides nucléiques. Nous lavons le culot à l'aide de 20 ml d'éther qui est éliminé par centrifugation puis nous séchons ce culot à l'étuve jusqu'à départ complet de l'éther. Il nous reste donc les protéines bactériennes qui sont mises en suspension dans 5 ml d'HCl 6 N et soumises à l'hydrolyse.

b) Hydrolyse.

L'hydrolyse est réalisée en ampoule scellée en présence d'acide chlorhydrique 6 N durant 18 heures à 100°. Après refroidissement, le liquide recueilli est filtré pour éliminer les matières charbonneuses en suspension, évaporé à sec au bain-marie bouillant, repris par quelques ml d'eau et évaporé à nouveau à sec jusqu'à départ complet de l'acide chlorhydrique. Le résidu dissous dans un minimum d'eau (2 à 3 gouttes), donne une solution directement utilisable pour la chromatographie sur papier.

c) Chromatographie sur papier.

Les chromatographies sont réalisées sur papier Whatmann n° 1 et nous avons pratiqué la méthode unidimensionnelle descendante ou ascendante et une technique semi-circulaire ascendante, modification des méthodes proposées par Marchal et Mittwer (192) et Ganguli (102) ; le détail opératoire de cette technique a été publié dans une note précédente (234).

Nous avons utilisé différents systèmes solvants :

a) Phénol	80 g
Ammonique	0,3 ml
Eau	20 ml.

Mélange homogène, indépendant des variations de température, recommandé par Roberts et coll (245).

- | | | |
|---|-----------|--------|
| b) n-butanol/acide acétique/eau
Partridge (228). | 80/20/100 | V/V de |
| c) Butanol sec/acide formique/eau
Roberts et coll (245). | 70/10/20 | V/V de |
| d) Méthyléthylcétone/acide propionique/eau
Clayton et Strong (54). | 75/25/30 | V/V de |

Ce dernier solvant est particulièrement pratique car il migre très rapidement, environ 40 cm en 16 heures.

Après développement, les chromatogrammes sont séchés 10 minutes à 85° puis révélés par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0,25 % dans le n-butanol.

Les acides aminés peuvent être caractérisés par leur R_f , déterminé dans les mêmes conditions à partir de témoins ; ce R_f est facile à mesurer rapidement en utilisant un calculateur établi selon Durant (81) ; mais cette méthode est sujette à de nombreuses causes d'erreurs et semble abandonnée ; il est préférable d'utiliser des témoins constitués par des mélanges connus d'acides aminés qui sont chromatographiés sur la même feuille que l'échantillon étudié et donc soumis aux mêmes conditions (texture et hydratation du papier, température, saturation de l'atmosphère dans l'enceinte à chromatographie...).

Dans certains cas, il est même nécessaire d'utiliser un témoin interne qui vient renforcer un spot à identifier et permet une comparaison plus facile avec un échantillon analysé en parallèle et non additionné du témoin.

d) Identification.

L'identification certaine des acides aminés séparés demande de nombreuses analyses qui sont réalisées de la façon suivante :

Une première chromatographie unidimensionnelle est effectuée sur une grande feuille de 50 x 46 cm en plaçant sur la ligne de départ 3 solutions témoins, contenant chacune 6 acides aminés choisis pour leurs R_f différents et la solution analysée qui est déposée sous forme d'un trait continu de 20 à 30 cm de long, large de 2 à 3 mm. Après développement et séchage, une bande verticale de 3 cm est découpée de chaque côté de l'échantillon et révélée en même temps que les témoins ; ceci permet de localiser, sur la partie médiane non révélée, différents groupes d'acides aminés. Les témoins rendent possible une première caractérisation. Des bandes transversales sont alors découpées, correspondant à des acides aminés ou à des groupes d'acides aminés ; ces bandes sont divisées en petits morceaux et éluées durant 12 heures dans 5 ml d'eau distillée. Les éluats sont évaporés à sec au bain-marie et le résidu est chromatographié dans les quatre systèmes solvants ci-avant nommés, en parallèle avec le témoin présumé pour chaque bande ; la correspondance des spots, inconnu et témoin, permet une identification certaine.

e) Dosage.

L'estimation des acides aminés après chromatographie sur papier est délicate et assez peu précise ainsi que l'a montré Chibnall (52) ; cependant de nombreuses techniques ont été proposées (163-264-248-147-115-316-157-300) ; elles se réduisent à l'une des modalités suivantes :

- a) Mesure de la densité optique des spots colorés à la ninhydrine et rendus transparents.
- b) Elution des spots suivie d'une des déterminations ci-après
 - Mesure de la densité optique de l'éluat coloré.
 - Dosage de l'azote par microkjeldahl.
 - Mesure de la densité optique d'un complexe cuivrique formé entre l'acide aminé et $(PO_4)_2 Cu_3$.
- c) Comparaison visuelle des spots avec des spots témoins correspondant à des quantités connues d'acides aminés.
- d) Mesure de la surface des spots.

Nous avons réalisé le dosage selon la technique de Sdobnikova (264) ; après révélation à la ninhydrine, les spots localisés sont découpés et révélés à fond dans 1,5 ml d'eau et 0,5 ml de solution de ninhydrine à 5 % dans un tampon à pH 7 durant 20 minutes au bain-marie bouillant.

Après refroidissement, on ajoute 5 ml d'acétone à 50 % et la densité optique des solutions colorées est mesurée au photomètre à une longueur d'onde de 550 mμ.

RESULTATS.

a) Qualitatifs.

L'examen direct des chromatogrammes ne nous a jamais révélé de différences qualitatives dans les acides aminés des protéines des trois souches E.coli N, SA 5 et SA 10.

Nous avons pu caractériser les acides aminés suivants :

Cystéine - histidine - lysine - arginine - sérine - glycolle - acide aspartique - alanine - acide glutamique - proline - valine - méthionine - leucine - phénylalanine - thréonine - tyrosine.

Le tryptophane, mis en évidence par Polson (236) n'a pu être caractérisé car il est détruit durant l'hydrolyse acide.

b) Quantitatifs.

L'aspect identique des chromatogrammes nous a amené à effectuer des dosages comparatifs entre les acides aminés des protéines de E.coli N et SA 5.

Partant de suspensions présentant la même densité optique initiale, nous avons obtenu les résultats qui figurent au tableau n° 43, exprimés en centièmes de densité optique.

La colonne 3 du tableau correspond aux valeurs obtenues pour les différents acides aminés de E.coli SA 5 en rapportant l'alanine à la même valeur dans les deux souches ; ceci permet de constater, colonne 1 et 3 qu'il n'y a pas de différence quantitative nette entre les deux souches.

Le dosage comparatif complète ainsi les nombreux chromatogrammes que nous avons réalisé et nous permet de conclure qu'il n'y a pas de différence nette, non seulement qualitative mais aussi quantitative, dans la composition des protéines de E.coli sensible et résistant à la sulfanilamide.

Tableau n° 43

Comparaison de la composition quantitative en acides aminés
des protéines de *E. coli* N et SA 5.

	<i>E. coli</i> N	<i>E. coli</i> SA 5	
	(1)	(2)	(3)
Alanine	79	90	79
Cystéine	0,5	2,5	2,2
Acide aspartique	3	4	3,5
Lysine + histidine	64	79	69
Arginine	35	39	34
Glycocolle + sérine	250	270	238
Thréonine	32	31,5	27,5
Acide glutamique	80	85	74
Proline	8,5	7,5	6,5
Tyrosine	16	16	14
Méthionine + valine	67	62	55
Phénylalanine	10	9	8
Leucine	66	74	65

II - ETUDE DES ACIDES NUCLEIQUES CHEZ *E. COLI* SENSIBLE ET RESISTANT A LA SULFANILAMIDE.

Nous avons abordé l'étude des acides nucléiques en nous basant sur différentes considérations : les purines étant douées de propriétés antisulfamides, on pouvait penser que les microorganismes résistants en fabriquent davantage et que celles-ci, libres ou combinées sous forme d'acides nucléiques, se retrouvaient à l'analyse ; d'autre part, la thymine, constituant de l'acide désoxyribonucléique, est synthétisée par l'intermédiaire du PAB, antisulfamide ; enfin les acides nucléiques interviennent dans la synthèse protéique (Brachet - 39) et dans la division cellulaire (Boivin et coll - 30) ; puisque les microorganismes sulfamidorésistants peuvent se multiplier en présence de sulfanilamide, on pouvait penser qu'ils synthétisent davantage d'acides nucléiques, ou bien qu'une quantité moindre leur suffit pour se reproduire ou encore que la composition des acides nucléiques est modifiée. Pour toutes ces raisons, une étude comparative du métabolisme des acides nucléiques chez *E. coli* sensible et sulfamidorésistant nous a paru devoir être tentée.

Une première étude (233) nous avait montré qu'il existait des différences dans les acides nucléiques de *E. coli* N et *E. coli* SA 5 ; nous avons repris systématiquement notre travail en vue de préciser le métabolisme des acides nucléiques durant la croissance et suivant des conditions expérimentales variées.

Nous avons ensuite étudié la composition des acides nucléiques de nos trois souches : nous savons en effet que l'acide désoxyribonucléique est considéré comme vecteur des caractères génétiques d'une espèce, et nous pouvions nous demander si la sulfamidorésistance de *E. coli*, qui se conserve durant de nombreuses générations en absence de sulfanilamide, pouvait se traduire par une modification de structure de l'acide désoxyribonucléique.

Nous avons également essayé d'induire des transformations de la souche *E. coli* N par action d'acide désoxyribonucléique de la souche *E. coli* SA 10, transformations analogues à celles qui furent réalisées par Avery et coll (8),

puis tentées par de nombreux auteurs avec plus ou moins de succès (29-7-183-325-2-75-14-131).

A - ETUDE QUANTITATIVE DES ACIDES NUCLEIQUES DE E.COLI SENSIBLE ET RESISTANT A LA SULFANILAMIDE.

I - TECHNIQUES DE DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES.

1/ Remarques préliminaires.

a) Nécessité d'une extraction totale des acides nucléiques : De nombreuses techniques d'extraction des acides nucléiques des tissus animaux et végétaux ou des microorganismes ont été publiées ; parmi celles-ci, les méthodes de Schneider (258) et de Schmidt et Thannhauser (257) permettent une extraction totale des acides nucléiques des bactéries. La méthode plus récente d'Ogur et Rosen (225) semble s'appliquer surtout aux tissus végétaux.

b) Le dosage des acides nucléiques se faisant d'après la teneur en phosphore, en sucre ou en bases, il est indispensable que les extraits obtenus ne renferment pas d'autres composés pouvant interférer dans les dosages de ces éléments : la méthode d'extraction de Schneider permet d'obtenir sélectivement les acides nucléiques.

c) Le dosage de chacun des deux acides nucléiques, acide ribonucléique (ARN) et acide désoxyribonucléique (ADN), est plus intéressant que le dosage de la totalité des acides nucléiques ; il faut donc disposer de méthodes permettant leur extraction séparée (Schmidt et Thannhauser) ou de méthodes permettant leur dosage différentiel (dosage par leurs bases spécifiques).

d) Le dosage des acides nucléiques d'après leurs oses nécessite l'emploi de substances étalons ; les oses constitutifs, ribose pour ARN et 2-désoxyribose pour ADN, ne sont cependant pas utilisables. Il a été démontré que seuls les nucléotides purs de ARN libèrent le ribose (Beljanski, 14, Moule 215,), ce qui rend nécessaire un étalonnage de la réaction sur un ARN aussi voisin que possible de celui que l'on veut doser.

Nous avons réalisé nos dosages en utilisant des solutions témoins de ARN de levure (Uclaf, Paris) et de ADN de thymus (BDH, Londres).

2/ Extraction des acides nucléiques.

Suivant le but recherché, nous avons utilisé deux techniques d'extraction :

- La méthode de Schneider pour l'étude quantitative des acides nucléiques.

- La méthode de Schmidt et Thannhauser pour l'étude des bases des acides nucléiques extraits séparément.

a) Méthode de Schneider.

Cette technique, élaborée pour l'extraction et le dosage des acides nucléiques des tissus, s'applique parfaitement aux microorganismes. Les deux acides nucléiques, acide ribonucléique (ARN) et acide désoxyribonucléique (ADN) sont partiellement hydrolysés durant l'extraction et leur séparation est impossible ; ils sont dosés grâce aux réactions que donnent leurs oses respectifs.

Les bactéries provenant d'une culture de 50 ml, recueillies par centrifugation à + 4°C, durant 20 minutes à 6 000 t/mn, sont lavées deux fois avec 50 ml de solution de ClNa (à 8,5 g/l) et de citrate de sodium (à 1 g/l) dans l'eau distillée froide (le citrate de sodium inhibe l'action des nucléases bactériennes) ; ces lavages éliminent le milieu de culture et la sulfanilamide.

Les décantations des liquides de lavages sont réalisées avec un siphon d'Ambard relié à une trompe à eau, dispositif très pratique qui permet une élimination rapide du liquide sans perte de bactéries.

Le culot bactérien est mis en suspension homogène dans de l'eau distillée Q.S.p 50 ml ; 10 ml de cette suspension sont prélevés pour effectuer un dosage d'azote total bactérien après minéralisation.

Le reste de la suspension est additionné de 20 ml d'ATC à 20 % froid ; après mélange, la suspension est abandonnée à + 4°C durant au moins 30 minutes puis centrifugée à basse température. Le culot bactérien est lavé dans 20 ml d'ATC à 1 % froid, la suspension est centrifugée puis le liquide surnageant est jeté.

Le culot est repris deux fois de suite durant 20 minutes au bain-marie bouillant d'abord par 5 ml puis par 4 ml d'ATC à 5 %.

Les liquides résultant de ces deux extractions sont mélangés, complétés à 10 ml puis filtrés, ce qui donne une solution contenant les acides nucléiques.

Etant donné que nous réalisons le dosage des acides nucléiques d'après leur teneur en oses, l'élimination préalable des phosphoprotéines par un mélange alcool-éther ne nous a pas paru nécessaire, en accord avec de nombreux auteurs.

Nous nous sommes assuré que les deux extractions par ATC 5 % au bain-marie permettent d'obtenir la totalité des acides nucléiques bactériens.

b) Méthode de Schmidt-Thannhauser.

Cette technique permet d'extraire séparément ARN et ADN par une hydrolyse alcaline qui dégrade ARN en mononucléotides et n'attaque pas ADN. Les deux acides sont ensuite estimés généralement d'après le phosphore qu'ils contiennent.

Cette méthode a été employée dans l'étude des bases des acides nucléiques. Pour obtenir suffisamment d'ARN et d'ADN, nous sommes obligé de partir d'une quantité de bactéries correspondant à la récolte de 2 ou 3 litres de culture.

Les bactéries récoltées sont lavées, extraites avec ATC au froid, lavées avec ATC à 1 % comme dans la méthode précédente. Elles sont ensuite mises en suspension dans un mélange alcool-éther (1/3) et placées 20 minutes dans un bain-marie à 45° pour éliminer les lipides. Après centrifugation et élimination de l'éther par séchage au bain-marie, le culot bactérien est traité par NaOH ou KOH.

1/ Traitement par NaOH.

Le culot d'une récolte de 500 ml, ainsi traité, est additionné de 10 ml de NaOH N et abandonné durant 24 heures à l'étuve à 37° en flacon bouché. Après centrifugation, le liquide recueilli est neutralisé par 1 ml de ClH 10 N puis additionné de 1 ml de ATC 20 % ; il se forme un précipité contenant ADN et les protéines ; ce précipité est recueilli par centrifugation puis lavé deux fois avec ATC 1 % froid, les liquides étant ajoutés au premier centrifugat.

Les liquides renferment ARN sous forme de nucléotides qui ont été libérés durant l'hydrolyse alcaline ; après dialyse de 24 heures contre de l'eau courante et évaporation à sec au bain-marie, on obtient un résidu blanc qui est séché sur P₂O₅ durant 24 heures avant d'être hydrolysé pour l'analyse des bases.

Le culot recueilli précédemment est traité deux fois durant 20 minutes au bain-marie bouillant par 5 ml d'ATC à 5 % pour extraire l'ADN. Les solutions extractives sont mélangées et ATC est éliminé par 2 agitations avec 100 ml d'éther : la solution aqueuse d'ADN est ensuite évaporée à sec au bain-marie bouillant puis séchée sur P_2O_5 .

2/ Traitement par KOH.

Ce traitement s'effectue dans les mêmes conditions en remplaçant NaOH par 10 ml de KOH N. La séparation d'ARN et d'ADN se réalise dans les mêmes conditions, seul le traitement de la solution des nucléotides d'ARN est différent : la solution de nucléotides est refroidie dans un bain d'eau glacée et additionnée de 0,45 ml de ClO_4H à 65 % ; ClO_4K précipité est éliminé par centrifugation à basse température et le liquide surnageant est traité deux fois par 100 ml d'éther qui élimine ATC.

Ce traitement remplace la dialyse de la technique précédente et devrait donner un ARN purifié, mais il reste vraisemblablement des traces d'acide perchlorique et l'évaporation à sec de la solution amène un début d'hydrolyse de ARN.

3/ Dosage des acides nucléiques.

L'estimation des acides nucléiques est généralement déduite du dosage de l'un des éléments constitutifs, ce qui prête à critique, la composition de ces acides étant susceptible de varier suivant l'origine de l'échantillon ; ainsi les auteurs admettent une teneur standard en phosphore de 9,5 % pour ARN et 9,9 % pour ADN.

a) Dosage du phosphore contenu dans les acides nucléiques.

Le dosage des acides nucléiques d'après leur teneur en phosphore n'est valable que si le phosphore dosé provient exclusivement de l'acide nucléique, ce qui est contesté dans le cas d'une extraction réalisée suivant la méthode de Schmidt et Thannhauser (Perey et coll - 230 - Martin et Morton - 198 - Jones et coll - 139 - Drasher - 79) ; Marco et Butler (194) pensent qu'il se produit une dégradation partielle de ADN durant l'hydrolyse alcaline de sorte que le dosage du phosphore de ARN se trouverait faussé par excès. Sous cette réserve, indiquons qu'il existe d'excellentes méthodes de dosage du phosphore (Fiske et Sulbarow - 96 - Macheboeuf et Delsal - 180), très sensibles et permettant de travailler sur de faibles quantités d'acides nucléiques. Cependant, cette détermination nécessite une minéralisation préalable des substances organiques, réalisée par un mélange sulfonitrique ; il est nécessaire d'éliminer ensuite l'excès d'acide nitrique à l'aide d'une solution de chlorure d'ammonium car cet acide gêne le développement de la coloration finale (Métais - 204).

Pour toutes ces raisons, nous n'avons pas dosé les acides nucléiques d'après leur teneur en phosphore.

b) Dosage des oses contenus dans les acides nucléiques.

Il est bien établi que les oses des acides nucléiques sont caractéristiques, le ribose de l'ARN et le 2-désoxyribose de l'ADN, de sorte qu'un dosage spécifique de ces sucres permet l'estimation des deux acides nucléiques mélangés, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer une séparation.

1/ Dosage du désoxyribose et de ADN.

De nombreuses réactions colorées permettent d'effectuer le dosage du désoxyribose :

- Réaction avec la diphenylamine : proposée par Dische (77), cette technique très utilisée a été modifiée par différents auteurs (265-73-70-310) pour la rendre plus sensible. La coloration bleue développée est mesurée au spectrophotomètre.

- Réaction avec la cystéine, proposée par Dische puis étudiée par Stumpf (282).

- Réaction avec le tryptophane proposée par Cohen (55).

- Réaction avec l'indole proposée par Dische puis étudiée par Ceriotti (46) et adaptée en ultra-micro-méthode par Keck (149).

- Réaction avec le carbazol, décrite par Gurin (114) ; mais cette réaction n'est pas spécifique du désoxyribose et ne peut donc être utilisée qu'en présence d'un échantillon purifié.

Le dosage du désoxyribose de ADN nécessite l'utilisation d'un produit témoin car la libération du sucre lié aux bases pyrimidiques est très difficile ; nous avons utilisé comme produit de référence un ADN extrait du thymus de veau, selon la technique de Kay (146) en remplaçant le Duponol (dodecylsulfate de Na) par du lauryl sulfonate d'ammonium : nous avons obtenu un ADN fibreux, qui a été purifié par la méthode de déprotéinisation de Sevag (267). Le rapport N/P = 1,68 établi par dosage, est en accord avec les valeurs publiées. Par la suite, nous avons pu nous procurer dans le commerce de l'ADN pur (BDH, Londres) livré sous forme de sel de sodium. Une solution étalon est préparée avec ce sel de sodium, séché à poids constant et dissous dans ATC à 5 % au bain-marie ; après dosage du sodium, la solution est amenée à une concentration de 2 mg/ml d'ADN. Elle est conservée à basse température et sert à préparer une solution standard extemporanée à 200 µg/ml ; cette solution est utilisée pour réaliser des gammes étalons à chaque série de dosages. Nous avons vérifié, par chromatographie sur papier, que le produit était exempt d'uracile donc de ARN.

Dans nos recherches nous avons dosé le désoxyribose par la méthode de Dische, pratiquée sur l'extrait trichloracétique renfermant les deux acides, ARN et ADN, obtenu par la méthode de Schneider.

Dans un tube à essais de 180 x 18 mm, nous mesurons 4 ml d'extrait ATC puis 8 ml de réactif de Dische (1 g de diphenylamine R.P. dissous dans 98 ml d'acide acétique R.P. et 2 ml d'acide sulfurique concentré R.P.).

Après mélange, la série de tubes est placée au bain-marie bouillant, durant 10 minutes ; les tubes sont ensuite refroidis dans un bain d'eau courante puis la coloration bleue qui s'est développée est mesurée au spectrophotomètre Coleman à une longueur d'onde de 610 mµ en tube calibré. Une gamme étalon allant de 0 à 800 µg dans la prise d'essai est traitée dans les mêmes conditions.

Nous n'avons pas opéré la réaction dans des tubes munis d'un réfrigérant, la concordance des gammes d'une série à l'autre nous assurant la validité de nos résultats.

Nous avons vérifié que la réaction à la diphenylamine n'est pas perturbée par la présence du ribose de ARN ou par l'acide trichloracétique de l'extrait.

2/ Dosage du ribose et de ARN.

Les dosages du ribose sont basés sur une réaction colorée avec l'orcinol en milieu chlorhydrique, en présence de chlorure ferrique selon la technique classique de Bial, ou en présence de chlorure cuivrique suivant

Barrenschéen et Peham (12). La méthode généralement utilisée est celle de Mejbaum (201) modifiée par différents auteurs (1-9). Une réaction colorée avec la cystéine a été proposée par Bakay et coll (10).

L'utilisation du ribose n'étant pas valable comme étalon, nous avons utilisé un ARN de levure (Uclaf, Paris). Nous avons vérifié que cet ARN est correct ; il renferme 15,25 % d'azote et 8,5 % de phosphore ; il est exempt d'ADN car il ne donne pas de réaction colorée avec la diphenylamine et d'autre part la chromatographie ne révèle pas de thymine.

Comme dans le cas d'ADN, nous avons préparé une solution à 2 mg/ml qui permet d'obtenir extemporanément une solution standard à 200 µg/ml.

Nous avons dosé le ribose par la méthode de Mejbaum pratiquée sur l'extrait trichloracétique obtenu durant l'extraction par la méthode de Schneider.

Dans un tube à essais de 180 x 18 mm, nous mesurons 1 ml d'extrait trichloracétique, 2 ml d'eau distillée et 3,5 ml du réactif orcinol-chlorure ferrique préparé extemporanément par mélange de deux solutions (3 ml d'acide chlorhydrique fumant contenant 0,9 % de perchlorure de fer (Codex) et 0,5 ml d'une solution d'orcinol à 10 % dans l'éthanol à 95°).

Après mélange, les tubes sont placés dans un bain-marie bouillant durant 20 minutes, refroidis dans un bain d'eau courante, puis additionnés de 10 ml d'eau. La coloration verte développée est mesurée au spectrophotomètre Coleman à une longueur d'onde de 625 mµ en tube calibré.

Une gamme étalon allant de 0 à 600 µg est traitée dans les mêmes conditions pour chaque série de dosages. Il est nécessaire d'utiliser un orcinol purifié par deux cristallisations dans le benzène et le chloroforme (305) de façon à ce que les cristaux donnent une solution alcoolique incolore.

Dans certains cas où la concentration en ARN dans l'extrait trichloracétique est faible, nous opérons le dosage sur une prise d'essai de 3 ml ; or la quantité d'ATC si elle ne gêne pas le développement de la coloration, produit un trouble qui rend les lectures impossibles ; nous extrayons la coloration verte par 5 ou 10 ml d'alcool amylique que nous décantons ensuite à la pipette selon Davidson et Waymouth (66) ; la gamme étalon est traitée de la même façon.

II - RESULTATS.

1/ Données bibliographiques.

L'étude des acides nucléiques bactériens est entrée dans une phase active depuis les travaux de Belozersky (20) et Boivin et Vendrely (28) montrant que la forte teneur des microorganismes en ces produits pourrait être responsable de leur vitalité exceptionnelle.

On y trouve les deux acides, ARN dans le cytoplasme et ADN dans le noyau, la présence même d'ADN confirmant l'existence du noyau ou de l'organite qui en tient lieu, mis en évidence par les travaux de Robinow (247) et de Tulasne et Vendrely (293).

Les proportions relatives des deux acides varient de 2 à 3 pour les bactéries jusque 15 à 20 pour les levures ; pour E.coli, Mitchell et Moyle (209) indiquent un rapport ARN/ADN de 3,4, Vendrely (295) trouve 2,5. Des variations s'observent d'une espèce à l'autre mais, pour une espèce donnée, il existe des variations suivant l'état physiologique ; Di Carlo et Schlutz (76) décèlent une forte augmentation de ARN et ADN dans les cellules de levure en croissance rapide et Morse et Carter (213) montrent que les con-

centrations de ARN et ADN atteignent un maximum au début de la croissance logarithmique de *E.coli*, résultats confirmés sur différentes espèces bactériennes par les travaux de nombreux auteurs (40-95-143-199-93-176-294).

Caldwell et Hinshelwood (43) calculant la teneur en acides nucléiques par cellule durant la croissance de *B.lactis aerogenes*, montrent que, malgré les variations de l'azote total, ADN reste constant par cellule et voisin de 2 mg pour 10^{12} cellules, alors que ARN subit de fortes variations de 3 à 32 mg pour 10^{12} cellules.

L'influence de nombreuses drogues sur le métabolisme des acides nucléiques a été étudiée pour tenter d'expliquer le mécanisme de leur action. Ainsi, la pénicilline provoquerait une accumulation de nucléotides qui ne seraient pas utilisés pour synthétiser la molécule d'acide ribonucléique (Gros et coll - 112, Beljanski - 16, Kandler et coll - 144, Nermut et Drasil - 219, Lark et Lark - 165).

Mandel et Sensenbrenner (185) notent une forte diminution du rapport ARN/ADN qui passe de 2,84 chez *Proteus vulgaris* P 18 à 0,97 dans les formes L qui en dérivent sous l'action de la pénicilline. Alimchandani et Sreenivasan (4) montrent que cette action perturbatrice de la pénicilline dans le métabolisme de ARN chez *Lactobacillus casei* peut être évitée par addition d'acide folique et de vitamine B12.

L'action de la chloromycétine est assez voisine de celle de la pénicilline : Pardee et coll (227) montrent que *E.coli* synthétise un ARN atypique sous l'influence de cet antibiotique, résultats confirmés par Neidhardt et Gros (217) puis Hahn et coll (117) et cet ARN ne serait pas utilisable dans la synthèse protéique. Des recherches analogues avaient montré que l'acide usnique, isolé des lichens, provoque une accumulation d'ARN chez *Staphylococcus aureus* sans synthèse protéique (Miura et coll - 210). Il semblerait donc que la chloromycétine n'inhibe pas la synthèse d'ARN, atypique ou non, mais empêche son utilisation.

L'action de la streptomycine sur le métabolisme des acides nucléiques a été étudiée par Beljanski (15) chez *Staphylococcus aureus* ; cet auteur constate que la souche résistante accumule plus d'ARN que la souche sensible ; il observe des faits analogues chez *E.coli* sensible et résistant ; par contre chez *Mycobacterium tuberculosis* (18) et *Salmonella enteridis* (17) les souches résistantes à la streptomycine accumulent les deux types d'acides nucléiques.

Dobrowolska et coll (78) constatent également une accumulation d'ARN dans les souches de *Shigella* sous l'influence de la streptomycine, résultats obtenus également par Belozerskii et coll (21) avec *Micrococcus pyogenes* et *E.coli*.

Popenenkova (237) montre que des bactéries intestinales résistantes à la grisémine tendent à accumuler de l'ADN.

L'action des sulfamides sur le métabolisme des acides nucléiques semble avoir été peu étudiée ; Shive et Roberts (274) montrent qu'en présence d'adénine, l'action bactériostatique des sulfamides sur *Lactobacillus arabinosus* est fortement diminuée, ce qui laissait prévoir que les sulfamides interviennent dans la synthèse des purines. Schopfer (260) étudiant l'action antisulfamide de l'adénine sur une souche de *Saccharomyces* sulfamido-sensible, montra que l'acide ribonucléique subit une modification telle qu'il devient plus facilement attaquant par la ribonucléase. Beljanski (14) comparant l'évolution des acides nucléiques chez *Staphylococcus aureus* sensible et résistant à la sulfanilamide, signale une accumulation d'ADN par la souche résistante alors que le métabolisme de ARN est sensiblement identique pour les deux souches.

L'action perturbatrice d'autres produits a été également étudiée : gaz moutarde (125), sels de cobalt (211), hydrocarbures cancérigènes (32), rayonnement ultraviolet (137). De même, des cultures réalisées en milieu déficient entraînent une modification du métabolisme des acides nucléiques : ainsi Prusoff et coll (241) montrent l'influence de l'acide ptéroylglutamique (PGA) dans la synthèse de ADN chez *Lactobacillus casei* ; une déficience en PGA dans le milieu, entraîne une diminution de la synthèse de ADN sans altérer celle de ARN ; la thymine peut remplacer PGA comme facteur de croissance pour cet organisme et restaure la synthèse de ADN ; ces résultats furent confirmés par Rege et Sreenivasan (242) et selon Stokes (280) l'acide folique ferait partie d'un système enzymatique responsable de la synthèse de la thymine qui entre ensuite dans ADN en passant par la forme de désoxyriboside sous l'influence de la vitamine B12.

Boreck et coll (35) constatent qu'un mutant de *E.coli* K 12 accumule ARN quand il est privé de méthionine mais Pardee et Prestidge (226), Gros et Gros (113) montrent que la déficience en acides aminés entraîne une diminution de la synthèse des acides nucléiques.

2/ Travaux personnels.

Nous avons déterminé la quantité d'ADN et d'ARN dans *E.coli* N, SA 5, SA 10 prélevés dans différentes conditions de culture en milieu aéré ou non aéré :

- a) en fin de phase de croissance logarithmique.
- b) à différentes étapes de la croissance.
- c) en présence ou non de sulfanilamide.

Nous avons dosé séparément ARN et ADN et nous avons déterminé les rapports ARN/N, ADN/N, ARN/ADN, N représentant l'azote total bactérien ; c'est la valeur qui nous a paru la plus valable pour refléter la quantité de matière vivante synthétisée durant la culture ; en effet, la détermination du poids sec bactérien s'avérerait délicate quand nous travaillions avec de faibles récoltes bactériennes et nous avons d'ailleurs montré (chapitre I) la concordance entre azote total et poids sec dans nos conditions expérimentales. La détermination du nombre de bactéries serait évidemment le meilleur critère, mais elle est difficile à réaliser avec une précision suffisante : des essais nous ont montré qu'il ne faut guère compter sur une précision supérieure à 10 % pour des numérations en cellules compte-germes et ces opérations devraient être répétées fréquemment au cours des expériences.

D'autre part, travaillant sur du matériel biologique, nous avons dû faire appel au calcul statistique pour déterminer des valeurs moyennes avec leur déviation standard σ , établie selon les formules classiques du calcul statistique.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n - 1}}$$

n représentant le nombre de déterminations réalisées dans une série et d la différence entre une valeur particulière et la moyenne arithmétique des valeurs obtenues dans une série d'expériences.

a) Etude quantitative des acides nucléiques en fin de croissance logarithmique.

Les cultures de *E.coli* N en milieu non sulfamidé et de *E.coli* SA 5 en milieu sulfamidé à 5 g/l sont prélevées au bout de 13 à 14 heures, quand les bactéries ont terminé leur croissance et arrivent en phase stationnaire. Pour *E.coli* SA 10 en milieu sulfamidé à 10 g/l, la récolte est effectuée après 24 heures, la croissance de cette souche étant plus lente (chapitre III).

Nous avons étudié la synthèse des acides nucléiques en milieu aéré et non aéré.

Les tableaux n° 44 - 45 - 46 rapportent les résultats obtenus en milieu aéré.

Tableau n° 44

Acides nucléiques de E.coli N cultivé en milieu aéré non sulfamidé, récolté en fin de croissance logarithmique.

D.O de la culture	$\frac{\text{ARN}}{\text{N}}$	$\frac{\text{ADN}}{\text{N}}$	$\frac{\text{ARN}}{\text{ADN}}$
39	1,07	0,520	2,06
52	1,06	0,579	1,84
56	0,98	0,483	2,03
69	0,93	0,464	2,00
70	1,09	0,495	2,21
74	1,07	0,556	1,92
75	1,02	0,550	1,86
76	0,98	0,520	1,89
80	1,12	0,489	2,30
83	1,09	0,491	2,22
87	1,03	0,468	2,19
87	1,10	0,502	2,18
88	0,99	0,530	1,86
88	1,12	0,571	1,97
95	1,04	0,529	1,97
Moyenne	1,04	0,516	2,03
$\pm \sigma$	$\pm 0,05$	$\pm 0,035$	$\pm 0,14$

Tableau n° 45

Acides nucléiques de E.coli SA 5 cultivé en milieu aéré sulfamidé à 5 g/l, récolté en fin de croissance logarithmique.

D.O de la culture	$\frac{\text{ARN}}{\text{N}}$	$\frac{\text{ADN}}{\text{N}}$	$\frac{\text{ARN}}{\text{ADN}}$
58,5	1,10	0,410	2,68
62	1,04	0,357	2,90
71	1,07	0,366	2,93
74	1,00	0,357	2,79
74	0,89	0,365	2,45
80	1,10	0,442	2,50
80	1,06	0,359	2,95
81	1,17	0,44	2,66
84	1,07	0,424	2,52
88	0,88	0,318	2,75
88	1,01	0,390	2,58
94	0,80	0,395	2,03
97	1,00	0,386	2,60
100	1,02	0,412	2,48
Moyenne	1,01	0,387	2,63
$\pm \sigma$	$\pm 0,09$	$\pm 0,035$	$\pm 0,07$

Tableau n° 46

Acides nucléiques de E.coli SA 10 cultivé en milieu aéré sulfamidé à 10 g/l, récolté en fin de croissance logarithmique.

D.O de la culture	$\frac{ARN}{N}$	$\frac{ADN}{N}$	$\frac{ARN}{ADN}$
55	0,91	0,396	2,30
56	0,97	0,485	2,00
56	0,95	0,45	2,10
56	0,92	0,376	2,48
58	0,92	0,384	2,40
58	0,91	0,465	2,01
58	0,99	0,407	2,44
60	0,99	0,440	2,26
61	0,97	0,395	2,46
61	0,99	0,436	2,29
61	0,97	0,426	2,28
64	0,89	0,407	2,19
Moyenne	0,95	0,422	2,26
$\pm \sigma$	$\pm 0,03$	$\pm 0,033$	$\pm 0,16$

Les tableaux n° 47 - 48 - 49 rapportent les résultats obtenus en milieu non aéré.

Tableau n° 47

Acides nucléiques de E.coli N cultivé en milieu non aéré, non sulfamidé, récolté en fin de croissance logarithmique.

D.O de la culture	$\frac{ARN}{N}$	$\frac{ADN}{N}$	$\frac{ARN}{ADN}$
25	1,11	0,444	2,49
31	1,26	0,470	2,69
31	1,27	0,466	2,73
32	1,21	0,430	2,81
32,5	1,10	0,463	2,39
33	1,17	0,463	2,52
33	1,18	0,466	2,55
33,5	1,18	0,452	2,60
33,5	1,22	0,436	2,80
34	1,22	0,421	2,90
34	1,16	0,405	2,83
34	1,22	0,414	2,95
34	1,19	0,420	2,82
34	1,23	0,411	2,98
34	1,05	0,410	2,56
34	1,13	0,420	2,68
34	1,17	0,456	2,55
34	1,20	0,426	2,81
34,5	1,25	0,451	2,77
34,5	1,14	0,422	2,69
Moyenne	1,18	0,437	2,70
$\pm \sigma$	$\pm 0,05$	$\pm 0,022$	$\pm 0,16$

Tableau n° 48

Acides nucléiques de E.coli SA 5 cultivé en milieu non aéré sulfamidé
à 5 g/l, récolté en fin de croissance logarithmique.

D.O de la culture	$\frac{ARN}{N}$	$\frac{ADN}{N}$	$\frac{ARN}{ADN}$
28	0,92	0,395	2,32
28	0,95	0,378	2,50
28,5	1,08	0,351	3,10
29	1,00	0,346	2,88
29	1,07	0,366	2,94
30	1,03	0,341	3,01
30,5	1,07	0,350	2,85
31	1,00	0,355	2,81
31	1,01	0,363	2,76
31	1,02	0,318	3,15
31	1,08	0,374	2,88
31	1,03	0,354	2,92
31	1,07	0,374	2,88
31	1,16	0,425	2,75
31,5	0,93	0,310	3,00
31,5	1,09	0,317	3,15
32	0,89	0,336	3,38
32	0,95	0,360	2,77
32	1,12	0,353	3,17
Moyenne	1,02	0,360	2,90
$\pm \sigma$	$\pm 0,07$	$\pm 0,019$	$\pm 0,24$

Tableau n° 49

Acides nucléiques de E.coli SA 10 cultivé en milieu non aéré sulfamidé
à 10 g/l, récolté en fin de croissance logarithmique.

D.O de la culture	$\frac{ARN}{N}$	$\frac{ADN}{N}$	$\frac{ARN}{ADN}$
16	0,79	0,354	2,24
16	0,84	0,377	2,24
16,5	0,75	0,352	2,11
17	0,74	0,378	1,97
17,5	0,77	0,349	2,22
17,5	0,71	0,389	1,83
18	0,86	0,414	2,08
18	0,67	0,346	1,93
18	0,79	0,370	2,14
18	0,63	0,368	1,71
18,5	0,87	0,373	2,32
19	0,63	0,363	1,74
19	0,84	0,394	2,13
19,5	0,87	0,352	2,48
20	0,83	0,388	2,14
Moyenne	0,77	0,371	2,08
$\pm \sigma$	$\pm 0,08$	$\pm 0,019$	$\pm 0,21$

Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne de deux déterminations pour chaque culture.

L'examen de ces tableaux nous montre tout d'abord que la D.O atteinte, lorsque la culture se trouve en fin de phase logarithmique, peut varier d'une expérience à l'autre ; cependant elle ne semble pas influencer sur la teneur en acides nucléiques ; par exemple, dans le tableau n° 44, nous constatons que le rapport ARN/N est sensiblement constant pour des cultures ayant atteint les D.O de 39,52, 75 et 95.

Pour faciliter la comparaison des résultats obtenus, nous les avons rassemblés dans le tableau n° 50.

Tableau n° 50

Résultats obtenus (moyenne $\pm$ déviation standard) dans les expériences précédentes.

<u>Culture aérée</u>	$\frac{\text{ARN}}{\text{N}}$	$\frac{\text{ADN}}{\text{N}}$	$\frac{\text{ARN}}{\text{ADN}}$
E.coli N	1,04 $\pm$ 0,05	0,51 $\pm$ 0,03	2,03 $\pm$ 0,14
E.coli SA 5	1,01 $\pm$ 0,09	0,39 $\pm$ 0,03	2,63 $\pm$ 0,07
E.coli SA 10	0,95 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,03	2,26 $\pm$ 0,16
<u>Culture non aérée</u>			
E.coli N	1,18 $\pm$ 0,05	0,44 $\pm$ 0,02	2,70 $\pm$ 0,16
E.coli SA 5	1,02 $\pm$ 0,07	0,36 $\pm$ 0,02	2,90 $\pm$ 0,24
E.coli SA 10	0,77 $\pm$ 0,08	0,37 $\pm$ 0,02	2,08 $\pm$ 0,21

DISCUSSION.

L'examen de ce tableau fait apparaître des différences qui, à première vue, paraissent assez nettes ; cependant le calcul statistique nous montre qu'elles sont rarement vraiment significatives et cela nous incite à une grande prudence dans l'interprétation que nous proposons.

En milieu aéré, les rapports calculés sont du même ordre pour E.coli SA 5 et SA 10 mais différents de E.coli N qui présente un rapport ADN/N plus fort ; cela pourrait correspondre :

- soit à une teneur en azote total plus élevée chez E.coli sulfamidorésistant, ce qui est peu probable étant donné que les rapports ARN/N sont voisins dans nos trois souches.

- soit à une teneur en ADN plus élevée chez E.coli N.

ce qui prouverait que la sulfamidorésistance s'accompagne d'une déficience de la synthèse de ADN ; or, nous savons que ADN renferme de la thymine dont la synthèse est sous la dépendance de l'acide folique, lui-même en rapport avec PAB impliqué dans la sulfamidorésistance. Il est donc possible de penser qu'une partie du PAB se trouve utilisée pour neutraliser la sulfamylamide, par un processus que nous ne connaissons pas, et de ce fait se trouve déviée de son rôle normal, entraînant ainsi une déficience en thymine et en ADN ; la quantité d'ADN nécessaire aux souches résistantes pour assurer leur multiplication serait synthétisée moins rapidement, ce qui pourrait

rendre compte de leur vitesse de croissance plus faible. Cependant E.coli SA 5 se multiplie presque aussi rapidement que E.coli N et on peut supposer qu'il diffère de E.coli N par le fait qu'il a besoin de moins d'ADN pour se diviser, ou alors que E.coli N possède de l'ADN supplémentaire, non fonctionnel ; cette notion n'est pas classique mais elle trouve une justification dans le fait que l'existence d'ARN fluctuant a été prouvée récemment (Pardee et coll - 227).

En milieu non aéré, E.coli SA 5 et SA 10 présentent des rapports ARN/N et ADN/N plus faibles que chez E.coli N ; si nous admettons que la teneur en azote n'est pas modifiée par l'aération, nous pouvons en déduire que la synthèse de ADN est déficiente dans les souches résistantes, comme c'était le cas en milieu aéré. La synthèse d'ARN serait également déficiente ; effectivement, la quantité de matière vivante synthétisée au cours de la croissance est moindre pour les souches résistantes que pour E.coli N, ce qui ressort de la D.O atteinte par les cultures des différentes souches.

En étudiant l'évolution des rapports ARN/N et ADN/N pour chaque souche, en fonction de l'aération du milieu, nous constatons que chez E.coli N, ARN/N est diminué alors que ADN/N est augmenté ; en admettant que l'azote total bactérien soit invariable, ce qui est vraisemblable, la diminution de ARN et l'élévation de ADN reflèteraient le métabolisme plus intense de E.coli N sous l'influence de l'aération.

Cette aération n'aurait pas d'effet marqué sur le métabolisme des acides nucléiques chez E.coli SA 5 et chez E.coli SA 10 la faible valeur de ARN/N traduirait la croissance plus lente de cette souche en milieu non aéré.

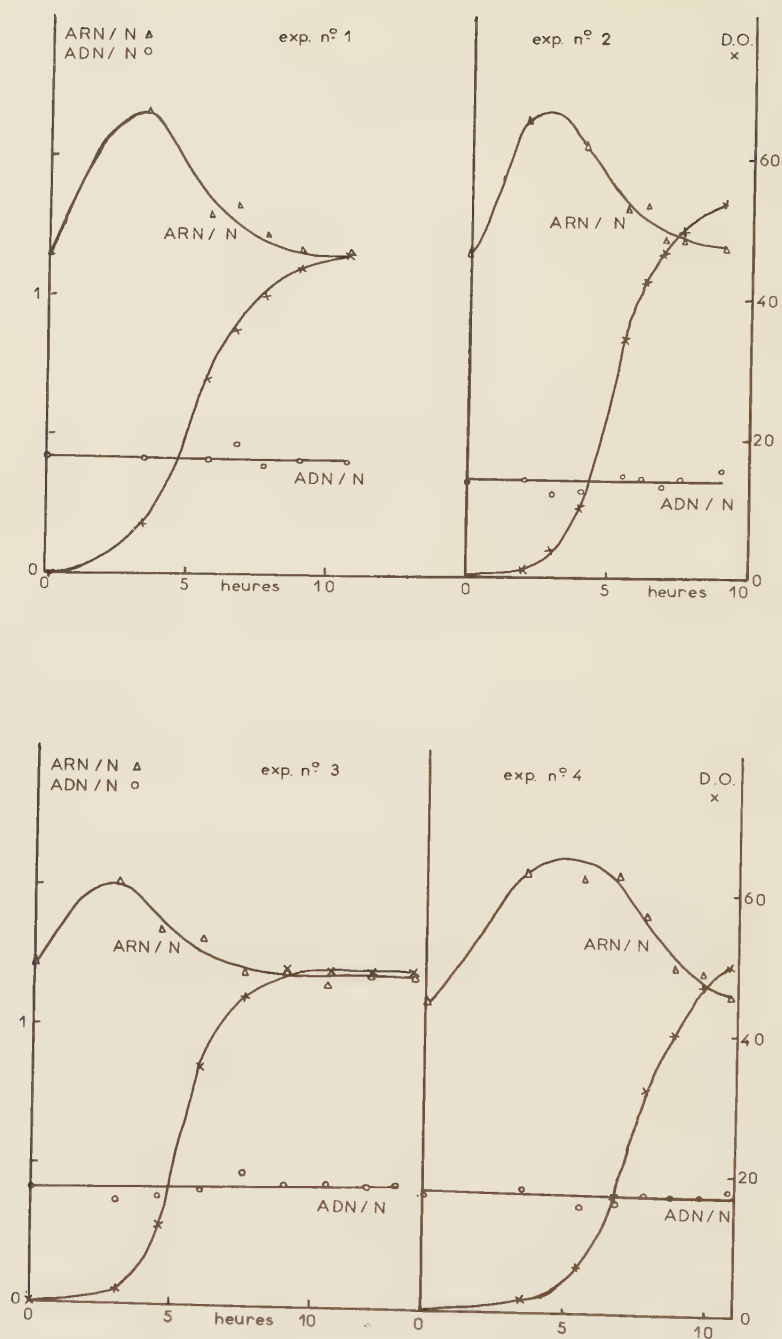
Les variations observées dans les acides nucléiques des trois souches étant de faible amplitude, nous avons pensé que si, au lieu de réaliser notre étude en fin de croissance logarithmique, nous étudions l'évolution des acides nucléiques durant la croissance bactérienne, nous obtiendrions des résultats plus nets.

b) Etude quantitative des acides nucléiques durant la croissance.

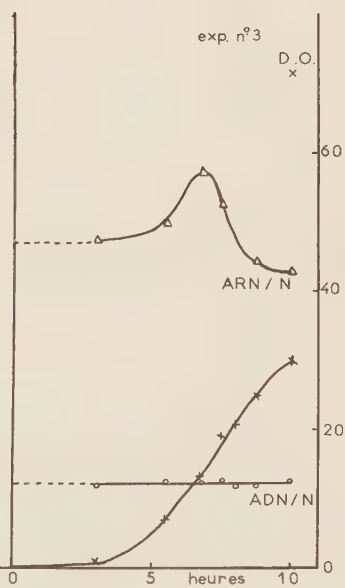
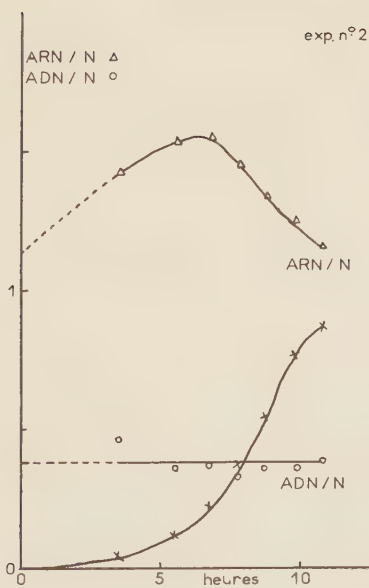
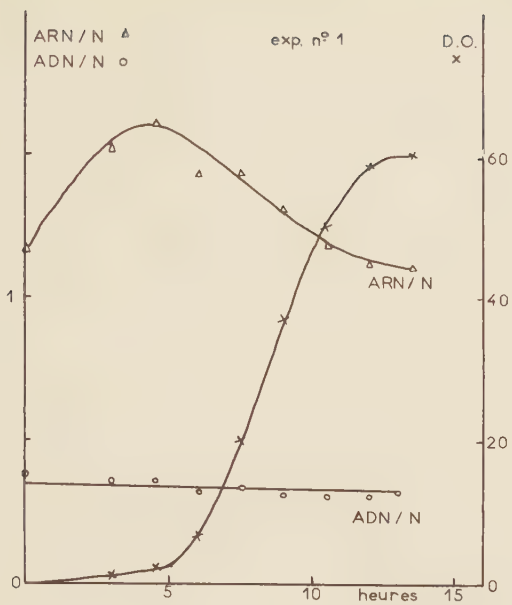
Nous avons déterminé les valeurs des rapports ARN/N, ADN/N et ARN/ADN de nos trois souches cultivées avec aération sur leur milieux respectifs. Pour obtenir une récolte suffisante dans les premières heures de la culture, nous avons opéré dans des ballons contenant deux litres de milieu.

Les tableaux et graphiques n° 51 - 52 - 53 rassemblent les résultats obtenus.

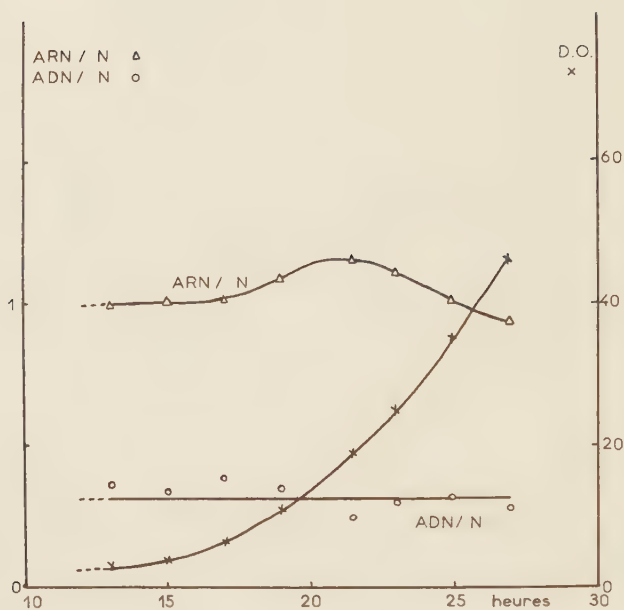
Le tableau n° 51 montre très nettement que ARN/N augmente dans les premières heures de la croissance pour revenir graduellement à sa valeur normale par la suite, résultat signalé par de nombreux auteurs (40-213-14). Or comme nous avons montré (chapitre III) que, dans nos conditions expérimentales, il n'y a pas de phase de latence et que la croissance se poursuit à un rythme régulier dès l'inoculation, cette augmentation transitoire et constante du rapport ARN/N nous paraît difficile à interpréter. Le rapport ADN/N est pratiquement constant et, puisque ADN est une constante cellulaire (Vendrel - 297, Caldwell et Hinshelwood - 43), il faut admettre que l'azote total est constant, donc que c'est bien ARN qui augmente au début de la culture. Cela pourrait être dû à une stimulation des cellules bactériennes lorsqu'elles sont placées dans un milieu neuf ; les synthèses seraient alors très actives et les bactéries accumuleraient un excès d'ARN qui serait utilisé par la suite, quand le milieu de culture s'enrichit en métabolites de déchet ou s'appauvrit en éléments nutritifs, ce qui ralentit les synthèses cellulaires.



Graphique 51 - Variations de la teneur en acides nucléiques durant la croissance de *E. coli* N.



Graphique 52 - Variations de la teneur en acides nucléiques durant la croissance de E.coli SA 5.



Graphique 53 - Variations de la teneur en acides nucléiques durant la croissance de *E. coli* SA 10.

Tableau n° 51

Evolution des acides nucléiques durant la croissance de *E. coli* N
en milieu aéré.

	Temps en heures, et minutes.	D.O	$\frac{\text{ARN}}{\text{N}}$	$\frac{\text{ADN}}{\text{N}}$	$\frac{\text{ARN}}{\text{ADN}}$
<u>Expérience n° 1</u>	0	0	1,15	0,41	2,80
	3.30	7	1,66	0,41	4,05
	5.45	28	1,18	0,40	3,19
	6.45	35	1,32	0,46	3,20
	7.45	40	1,22	0,38	3,15
	9	42	1,17	0,41	2,84
	10.45	46	1,16	0,40	2,89
<u>Expérience n° 2</u>	0	0	1,16	0,34	3,40
	2	1	1,63	0,35	4,55
	3	4	1,49	0,30	4,98
	4	10	1,55	0,31	4,90
	5.30	34	1,32	0,36	3,67
	6.15	42	1,33	0,35	3,75
	6.45	46	1,21	0,33	3,68
	7.30	50	1,21	0,36	3,40
	9	54	1,18	0,39	3,08
<u>Expérience n° 3</u>	0	0	1,22	0,41	2,99
	3	2	1,50	0,37	4,05
	4.30	11,5	1,34	0,38	3,52
	6	34	1,31	0,41	3,20
	7.30	44	1,19	0,47	2,54
	9	48	1,20	0,44	2,72
	10.30	48	1,15	0,44	2,62
	12	48	1,19	0,43	2,87
	13.30	48	1,17	0,44	2,66
<u>Expérience n° 4</u>	0	0	1,10	0,41	2,68
	3.30	2	1,56	0,44	3,54
	5.30	7	1,55	0,38	4,05
	6.45	17	1,56	0,39	3,96
	7.45	32	1,42	0,43	3,30
	8.45	40	1,24	0,42	2,95
	9.45	46,5	1,23	0,43	2,88
	10.45	50	1,14	0,44	2,54

Il serait donc nécessaire de dissocier la synthèse de ARN et celle des protéines, ainsi que le font Wade et Morgan (307) Hahn et coll (117) Ben Ishai (23) Aronson et Spiegelman (6) Borek et Ryan (36) après avoir constaté qu'en présence de chloromycétine, la synthèse protéique est inhibée alors que ARN continue à s'accumuler ; en particulier Wade et Morgan (307) puis Pardee et coll (227) admettent la présence d'un ARN "additionnel" ou "fluctuant" à côté d'un ARN "constitutionnel" lié à la synthèse protéique et qui reste constant.

Le tableau n° 52 montre le même phénomène d'augmentation transitoire de ARN/N, imputable à ARN car ADN/N est constant donc N est également constant ; mais cette augmentation est plus lente à se produire que dans le cas de *E. coli* N. Le tableau n° 53 confirme le fait pour *E. coli* SA 10, mais

l'augmentation de ARN est encore plus différée et moins nette qu'avec E. coli SA 5.

Tableau n° 52

Evolution des acides nucléiques durant la croissance de E.coli SA 5 en milieu sulfamidé à 5 g/l et aéré.

	Temps en heures et minutes.	D.O	$\frac{\text{ARN}}{\text{N}}$	$\frac{\text{ADN}}{\text{N}}$	$\frac{\text{ARN}}{\text{ADN}}$
<u>Expérience n° 1</u>	0	0	1,17	0,38	3,04
	3	1	1,52	0,36	4,32
	4.30	2	1,61	0,36	4,5
	6	6,5	1,43	0,32	4,51
	7.30	20	1,44	0,34	4,27
	9	37	1,31	0,38	4,26
	10.30	50	1,19	0,30	3,95
	12	58,5	1,12	0,30	3,72
	13.30	60	1,11	0,32	3,50
<u>Expérience n° 2</u>	3	2	1,43	0,47	3,04
	5.30	5	1,54	0,36	4,27
	6.45	9	1,56	0,37	4,21
	7.45	15	1,46	0,33	4,42
	8.45	22	1,34	0,36	3,72
	9.45	31	1,26	0,36	3,50
	10.45	35	1,16	0,38	3,05
<u>Expérience n° 3</u>	3	1	1,18	0,29	4,08
	5.30	7	1,24	0,31	4,00
	6.45	13	1,43	0,31	4,61
	7.30	19	1,32	0,31	4,26
	8	21	1,09	0,29	3,76
	8.45	24,5	1,10	0,29	3,80
	10	30	1,07	0,31	3,45

Tableau n° 53

Evolution des acides nucléiques durant la croissance de E.coli SA 10 en milieu sulfamidé à 10 g/l et aéré.

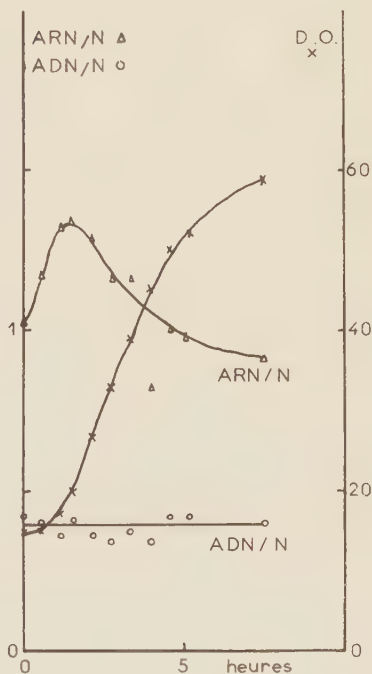
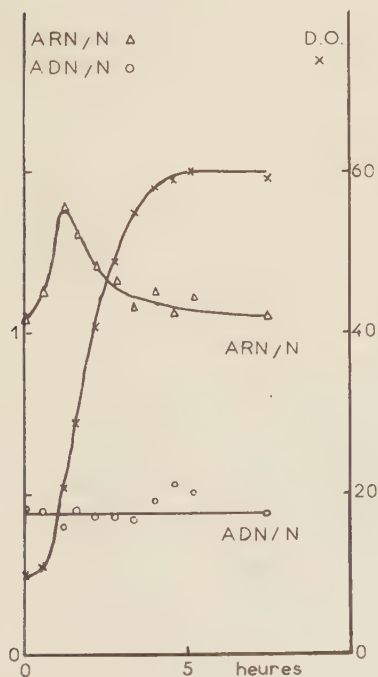
Temps en heures et minutes.	D.O	$\frac{\text{ARN}}{\text{N}}$	$\frac{\text{ADN}}{\text{N}}$	$\frac{\text{ARN}}{\text{ADN}}$
13	3,5	1,00	0,36	2,76
15	4	1,02	0,33	3,01
17	6,8	1,02	0,38	2,68
19	11	1,09	0,34	3,12
21.30	19	1,15	0,24	4,68
23	25	1,11	0,29	3,76
25	35	1,00	0,31	3,21
27	46	0,93	0,27	3,40

Donc en plaçant E.coli dans un milieu neuf, nous constatons une augmentation transitoire de ARN, le phénomène étant plus net avec E.coli N qu'avec les souches SA 5 et SA 10.

Nous avons voulu serrer le problème de plus près et voir si l'augmentation de ARN chez *E. coli* est immédiate lorsqu'on le place dans un milieu de culture neuf. Le dosage étant difficile à pratiquer au début de la croissance dans nos conditions habituelles, nous avons effectué des inoculats beaucoup plus abondants pour obtenir une récolte de bactéries utilisable dès les premières heures ; de ce fait, la croissance débute immédiatement de façon visible sans phase de latence, ainsi que le montrent les tableaux et graphiques n° 54 et 55. Nous constatons que ARN/N augmente en même temps que la densité optique, cette accumulation ne précédant pas l'élévation de la D.O., mais étant simultanée.

Nous avons voulu pousser les choses à l'extrême et nous nous sommes borné à plonger la totalité d'une récolte bactérienne dans un volume égal de milieu neuf. Les tableaux n° 56 et 57 nous montrent que l'effet de stimulation n'a pas eu lieu, la croissance bactérienne a été très lente et peu marquée, ARN/N n'a pas varié ; il semble que l'inoculat non lavé que nous avonsensemencé, ait apporté avec lui des substances nuisibles qui l'empêchent de bénéficier complètement des aliments fournis par le milieu neuf.

En résumé, l'étude de l'évolution des acides nucléiques durant la croissance nous montre que les phénomènes sont identiques pour les trois souches : la synthèse d'ADN est régulière comme celle de la matière vivante, le rapport ADN/N étant constant pendant toute la croissance. La synthèse de ARN est accrue lorsque les bactéries sont placées dans un milieu de culture neuf ; ce phénomène de stimulation est transitoire, il est plus net et plus précoce avec *E. coli* N qu'avec *E. coli* SA 5 et surtout qu'avec *E. coli* SA 10.



Graphiques 54 et 55 - Variations de la teneur en acides nucléiques à partir de forts inoculats.

n° 54 : *E. coli* N - n° 55 : *E. coli* SA 5.

Tableau n° 54

Evolution des acides nucléiques durant la croissance de *E.coli* N en milieu aéré, en réalisant un fort inoculat.

Temps en heures et minutes.	D.O	$\frac{ARN}{N}$	$\frac{ADN}{N}$	$\frac{ARN}{ADN}$
0	12	1,05	0,46	2,28
0.35	13	1,13	0,45	2,47
1.10	21	1,39	0,40	3,50
1.35	29	1,30	0,45	2,92
2.10	41	1,21	0,43	2,80
2.45	49	1,16	0,43	2,68
3.20	55	1,08	0,42	2,54
4	58	1,13	0,48	2,37
4.35	59	1,06	0,53	2,00
5.10	60	1,11	0,51	2,18
7.30	59	1,05	0,44	2,37
9.30	57	-	-	2,39

Tableau n° 55

Evolution des acides nucléiques durant la croissance de *E.coli* SA 5 en milieu sulfamidé à 5 g/l et aéré, en réalisant un fort inoculat.

Temps en heures et minutes.	D.O	$\frac{ARN}{N}$	$\frac{ADN}{N}$	$\frac{ARN}{ADN}$
0	15	1,02	0,42	2,37
0.35	15	1,17	0,40	2,95
1.10	17	1,32	0,36	3,60
1.35	20	1,34	0,41	3,26
2.10	27	1,28	0,36	3,58
2.45	33	1,16	0,34	3,36
3.20	39	1,16	0,37	3,18
4	45	0,82	0,34	2,52
4.35	50	1	0,42	2,40
5.10	52	0,98	0,42	2,38
7.30	59	0,91	0,40	2,32
9.30	57	-	-	2,66

Tableau n° 56

Evolution des acides nucléiques de *E.coli* N durant la croissance en milieu aéré, en réalisant un inoculat très important.

Temps en heures et minutes.	D.O	$\frac{ARN}{N}$	$\frac{ADN}{N}$	$\frac{ARN}{ADN}$
a) 0	81	1,06	0,57	1,86
1.30	84	1,06	0,53	2,01
3	83	1,07	0,56	1,91
5	89	0,99	0,53	1,86
8	94	0,99	0,55	1,80
b) 0	84	1,06	0,61	1,73
1.30	87	1,03	0,56	1,84
3	87	1,05	0,52	2,01
5	92	0,96	0,53	1,79
8	98	0,91	0,54	1,70

Tableau n° 57

Evolution des acides nucléiques de *E.coli* SA 5 durant la croissance en milieu sulfamidé à 5 g/l et aéré, en réalisant un inoculat très important.

Temps en heures et minutes.		D.O	$\frac{ARN}{N}$	$\frac{ADN}{N}$	$\frac{ARN}{ADN}$
a)	0	88	1,01	0,45	2,18
	1.30	84	1,05	0,50	2,11
	3	94	0,96	0,46	2,17
	5	101	0,79	0,43	1,81
	8	107	0,86	0,43	1,97
b)	0	79	0,98	0,44	2,19
	1.30	83	1,11	0,50	2,20
	3	86	0,92	0,45	2,05
	5	92	0,86	0,45	1,91
	8	98	0,88	0,50	1,76

c) Etude quantitative des acides nucléiques chez *E.coli* SA 5 et SA 10, cultivés en présence ou non de sulfanilamide.

Après avoir étudié le métabolisme des acides nucléiques chez *E.coli* SA 5 et SA 10 cultivés en milieu sulfamidé, nous avons voulu l'étudier chez ces mêmes bactéries cultivées en milieu non sulfamidé ; en effet, nous avons vu que les souches adaptées conservaient leur résistance quand elles sont cultivées en absence de sulfanilamide, même après de nombreuses générations ; nous pouvions donc nous demander si la valeur plus faible du rapport ADN/N observée pour ces souches, se maintenait et traduisait une perturbation durable du métabolisme de ADN.

Nous avons donc cultivé *E.coli* SA 5 et SA 10 durant 13 passages successifs de 24 heures en milieu non sulfamidé puis nous avons étudié les acides nucléiques de ces souches cultivées en milieu sulfamidé ou non. A titre de comparaison nous avons étudié, dans les mêmes conditions, les acides nucléiques de *E.coli* SA 5 et SA 10 n'ayant pas subi ces passages en milieu non sulfamidé.

Nous constatons, tableau n° 58 A 1, que le passage de *E.coli* SA 5 en milieu non sulfamidé modifie immédiatement la valeur du rapport ADN/N qui se trouve augmenté et voisin de celui de *E.coli* N ; cette modification se maintient et nous la retrouvons après douze autres passages en milieu normal (A 2).

La culture de *E.coli* SA 5 en milieu sulfamidé à 5 g/l donne les valeurs déjà trouvées pour ADN/N, que les bactéries inoculées viennent d'un milieu sulfamidé ou non. (B1 et B2). Il semble donc que la sulfanilamide perturbe la synthèse de ADN, tandis que ARN ne semble pas modifié, les rapports ARN/N étant identiques dans les quatre cas envisagés.

Avec *E.coli* SA 10, tableau n° 59, nous constatons des phénomènes analogues ; le rapport ADN/N est identique à celui de *E.coli* N, quand la culture est réalisée en milieu non sulfamidé, mais diminue quand le milieu est sulfamidé. Cependant nous trouvons des rapports ARN/N très bas lorsque *E.coli* SA 10 est cultivé en milieu non sulfamidé, après un seul ou treize passages. Comment peut-on tenter d'expliquer ce fait ? il est vraisemblable que *E.coli* SA 10, adapté à croître en milieu sulfamidé à 10 g/l, a modifié des systèmes enzymatiques pour lutter contre la toxicité du milieu ; ces mo-

difications lui permettent d'effectuer une synthèse protéique rapide lorsque les bactéries sont placées en milieu non sulfamidé.

Tableau n° 58

Acides nucléiques de *E.coli* SA 5 cultivé en milieu aéré,
en présence ou non de sulfanilamide.

	D.O	$\frac{ARN}{N}$	$\frac{ADN}{N}$	$\frac{ARN}{ADN}$
<u>A - Culture en milieu non sulfamidé, durant 14 heures.</u>				
1) <i>E.coli</i> SA 5 venant d'un milieu sulfamidé à 5 g/l.	82	0,82	0,51	1,62
	92	0,86	0,53	1,63
	89	0,82	0,51	1,60
	82	0,82	0,51	1,62
2) <i>E.coli</i> SA 5 cultivé 13 fois en milieu normal.	85	0,83	0,52	1,59
	82	0,82	0,52	1,59
	88	0,82	0,50	1,62
	88	0,83	0,52	1,59
<u>B - Culture en milieu sulfamidé à 5 g/l, durant 14 heures.</u>				
1) <i>E.coli</i> SA 5 venant d'un milieu sulfamidé à 5 g/l.	92	0,97	0,43	2,28
	76	0,82	0,41	2,02
	53	1,16	0,36	3,20
2) <i>E.coli</i> SA 5 cultivé 13 fois en milieu normal.	59	0,98	0,42	2,34
	76	0,85	0,42	2,04
	59	0,83	0,41	2,04
	72	0,85	0,43	1,98

Tableau n° 59

Acides nucléiques de *E.coli* SA 10 cultivé en milieu aéré,
en présence ou non de sulfanilamide.

	D.O	$\frac{ARN}{N}$	$\frac{ADN}{N}$	$\frac{ARN}{ADN}$
<u>A - Culture en milieu non sulfamidé, durant 14 heures.</u>				
1) <i>E.coli</i> SA 10 venant d'un milieu sulfamidé à 10 g/l.	84	0,38	0,53	0,72
	85	0,34	0,50	0,68
	88	0,42	0,52	0,81
	106	0,40	0,51	0,78
2) <i>E.coli</i> SA 10 cultivé 12 fois en milieu normal.	87	0,45	0,59	0,75
	87	0,44	0,56	0,78
	91	0,52	0,56	0,94
	94	0,46	0,56	0,84
<u>B - Culture en milieu sulfamidé à 10 g/l, durant 48 heures.</u>				
1) <i>E.coli</i> SA 10 venant d'un milieu sulfamidé à 10 g/l.	81	0,77	0,32	2,37
	86	0,75	0,31	2,36
	86	1,00	0,37	2,70
2) <i>E.coli</i> SA 10 cultivé 12 fois en milieu normal.	62	0,92	0,33	2,98
	68	0,92	0,32	2,84
	70	1,01	0,34	2,94

En résumé, la diminution de ADN, qui semblait caractériser *E.coli* sulfamidorésistant, ne se maintient pas lorsque ces microorganismes sont placés en milieu non sulfamidé, bien que leur résistance soit conservée. On peut donc se demander à quoi est dû le maintien de cette résistance au cours de nombreuses générations effectuées en absence de sulfanilamide. Peut-on l'attribuer à une modification de la composition de ADN vecteur des caractères héréditaires ? C'est donc dans la composition même de ADN que nous allons chercher à mettre en évidence un caractère auquel on puisse rattacher la sulfamidorésistance.

B - ETUDE COMPARATIVE DES BASES CONSTITUANT LES ACIDES NUCLÉIQUES.

Dans les acides nucléiques les proportions des différentes bases, et plus encore leur enchaînement, sont spécifiques et pourraient donc différer chez *E.coli* sensible et résistant à la sulfanilamide ; l'étude de la structure des molécules de ARN et ADN n'étant pas encore réalisable, nous avons dû nous contenter de la détermination quantitative des différentes bases.

1/ Techniques d'étude des bases constituant les acides nucléiques.

La possibilité de séparer les bases des acides nucléiques par chromatographie sur papier a été démontrée par Vischer et Chargaff (302) et par Hotchkiss (130) en 1947. Cette technique s'applique très bien aux faibles quantités d'acides nucléiques dont on dispose généralement dans les expériences effectuées sur des microorganismes.

Les techniques générales de la chromatographie sur papier sont maintenant bien connues et sont rassemblées dans des ouvrages tels que celui de Lederer (169).

L'étude des bases des acides nucléiques nécessite :

a) L'extraction séparée de ARN et ADN, pratiquée en général suivant la technique de Schmidt-Thannhauser.

b) L'hydrolyse des acides nucléiques s'avère plus délicate. ADN est assez facile à hydrolyser en présence d'acide chlorhydrique (Tamm et coll - 287, Gold et Sturgis - 106), d'acide perchlorique (Marshak et Vogel - 197), d'acide formique (Vischer et Chargaff - 304, Wyatt - 324, Laland et coll - 160) ou d'anhydride phosphorique (Narurkar et Sahasrabudhe - 216).

ARN est plus difficile à hydrolyser ; les bases pyrimidiques peuvent ne pas être libérées par des agents trop doux alors que des moyens énergiques risquent de détruire les bases puriques (61). Vischer et Chargaff préconisent une hydrolyse par l'acide formique ; Marshak (196) utilise l'acide perchlorique, Smith et Markham (276) l'acide sulfurique.

Des agents alcalins, NaOH ou NH_4OH (Boulanger et Montreuil - 38) ou KOH (Davidson et Smellie - 67) réalisent l'hydrolyse jusqu'au stade mononucléotide seulement. Une hydrolyse enzymatique a été également proposée (276) et par Hurst et coll (135).

c) La chromatographie ascendante ou descendante permet un grand choix de solvants suivant que l'hydrolyse a libéré les bases, les nucléotides ou les nucléosides des acides nucléiques : n-butanol aqueux (Hotchkiss - 130), n-butanol - eau - acide formique (Markham et Smith - 195), isopropanol - acide chlorhydrique - eau (Wyatt - 324), méthanol - méthyléthylcétone (Kirby - 152), quinoléine - collidine - eau (Boulanger et Montreuil - 37), tampons phosphatés (Zamenhof et coll - 331), acide isobutyrique - NH_3 (Magasanik et coll - 184).

d) La révélation des spots effectuée par des moyens physiques ou chimiques : révélation par une lumière ultraviolette selon (277) avec possibilité de photographier le chromatogramme ; révélation par formation de composés mercuriels (Vischer et Chargaff - 303) ou mise en évidence des groupements phosphorylés des nucléotides selon Hanes et Ischerwood (118).

La révélation des spots par l'ultraviolet est généralement préférable, car elle permet une extraction ultérieure en vue du dosage.

e) Le dosage des bases, réalisé après élution des spots et mesure de l'absorption en lumière ultraviolet, à des longueurs d'onde caractéristiques de chaque base.

Technique utilisée personnellement.

Les acides nucléiques extraits par la méthode de Schmidt-Thannhauser, sont hydrolysés par ClO_4H : dans un tube à essais de 100×10 mm nous plaçons 5 à 10 mg d'acide nucléique sec et III gouttes de ClO_4H à 65 %. Le tube est mis dans un bain-marie bouillant durant 90 minutes en agitant de temps en temps avec une baguette de verre. On obtient un liquide coloré en noir par des particules de charbon ; l'addition de 2 ml d'eau suivie d'une centrifugation prolongée élimine le dépôt charbonneux ; le liquide limpide recueilli est évaporé à sec au bain-marie et le résidu, repris par deux ou trois gouttes d'eau distillée, donne une solution directement utilisable pour la chromatographie.

Cette technique d'hydrolyse libère les bases puriques et pyrimidiques de ARN et de ADN.

La chromatographie est effectuée en technique descendante sur papier Whatmann n° 1 en utilisant le solvant préconisé par Wyatt (324) ; isopropanol 65 volumes - HCl concentré 17 volumes - H_2O Q.S.p 100 volumes. Ce solvant permet une bonne séparation des bases contenues dans les acides nucléiques bactériens, leurs R, étant nettement différents : 0,22 (guanine), 0,32 (adénine), 0,44 (cytosine), 0,66 (uracile), 0,76 (thymine).

Après saturation préalable du papier par les vapeurs du solvant dans la cuve à chromatographie, l'opération est mise en route et poursuivie durant 18 heures, ce qui permet une migration d'environ 40 cm. Sur chaque chromatogramme sont disposés des témoins constitués par des hydrolysats d'ARN de levure et d'ADN de thymus. D'autre part, une marge assez large est laissée libre sur le chromatogramme pour établir des témoins d'absorption lors des mesures quantitatives.

Le chromatogramme développé est séché durant 24 heures à la température ordinaire.

Les spots sont révélés en chambre noire sous une lumière ultraviolette (lampe Mineralight SL 2537). Les bases apparaissent sous forme de taches violettes sur le fond blanc du papier, la guanine étant caractérisée par une belle fluorescence bleutée.

Ces taches sont délimitées par un trait de crayon ce qui permet de les découper par la suite et de les placer chacune dans un tube à essais avec 5 ml d' HCl 0,1 N. Des témoins de surface identique sont découpés sur la marge vierge du chromatogramme et traités de la même façon : ils serviront à régler le zéro du spectrophotomètre.

Après 18 heures de contact à la température ambiante, en agitant de temps à autre, la densité optique des liquides extractifs est mesurée au spectrophotomètre Beckman, modèle DU, en cuves de quartz de 1 cm.

Pour chaque longueur d'onde utilisée, le zéro de l'appareil est réglé sur le témoin marginal ; Vischer et Chargaff (303) préconisent la lecture de l'absorption à deux longueurs d'onde différentes, pour éliminer l'influence des impuretés apportées par le papier ou les solvants ; la différence entre les deux valeurs est utilisée pour le calcul de la concentration en chaque base.

Nous avons déterminé la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption des différentes bases et nous avons trouvé en accord avec Vischer et Chargaff (303) les valeurs suivantes : 249 m μ (guanine), 262,5 m μ (adénine), 276 m μ (cytosine), 259 m μ (uracile), 264,5 (thymine).

Pour calculer la concentration des bases dans les liquides extractifs, nous utilisons les données de Vischer et Chargaff, confirmées par Crosbie, Smellie et Davidson (61) : les densités optiques de solutions renfermant 50 μ g de base dans 5 ml d'HCl 0,1 N, en cuve de 1 cm sont les suivantes :

- 0,900 pour l'adénine entre 262,5 et 290 m μ
- 0,475 pour la guanine entre 249 et 290 m μ
- 0,545 pour la cytosine entre 267,5 et 290 m μ
- 0,590 pour l'uracile entre 259 et 280 m μ
- 0,545 pour la thymine entre 264,5 et 290 m μ .

D'après ces données, il est facile de calculer la concentration en bases dans les liquides extractifs et d'exprimer les résultats en micromôles. Les proportions respectives des différentes bases d'un acide nucléique sont ensuite rapportées à la teneur en adénine prise comme unité ainsi que le font différents auteurs cités par Chargaff et Davidson (51).

2/ Résultats.

a) Etudes préliminaires.

Pour nous assurer que les méthodes employées nous donnaient des résultats valables, nous avons dosé les diverses bases contenues dans un échantillon d'acide ribonucléique de levure (Uclaf, Paris) et dans un acide désoxyribonucléique de thymus (BDH, Londres).

1/ Dosage des bases de l'acide ribonucléique.

Nous avons réalisé 8 analyses sur ARN hydrolysé par l'acide perchlorique selon Marshak et Vogel (197) ; après chromatographie sur papier, les différentes bases sont dosées par mesure de leur absorption en lumière ultraviolette selon les techniques indiquées précédemment.

Nous rapportons les résultats obtenus dans le tableau n° 60 où nous avons calculé les différentes bases en rapportant l'adénine à la valeur uniforme de 1 selon Chargaff et Davidson (51).

Nous obtenons une valeur moyenne de 1,57 pour le rapport bases puriques/bases pyrimidiques, valeur voisine de celle de 1,48 indiquée par Marshak et Vogel (197).

Tableau n° 60

Etudes des bases de ARN de levure (Uclaf).

	Guanine	Adénine	Cytosine	Uracile	$\frac{A + G}{C + U}$
					$\frac{\text{Purines}}{\text{Pyrimidines}}$
	0,89	1	0,56	0,61	1,61
	0,84	1	0,64	0,57	1,52
	0,99	1	0,63	0,72	1,47
	0,95	1	0,63	0,71	1,48
	0,90	1	0,52	0,63	1,65
	0,87	1	0,56	0,56	1,67
	0,88	1	0,68	0,47	1,63
	0,91	1	0,55	0,63	1,62
Moyenne	0,90	1	0,60	0,61	1,57
$\pm \sigma$	0,04		$\pm 0,05$	$\pm 0,08$	$\pm 0,06$

2/ Dosage des bases de l'acide désoxyribonucléique.

Les résultats obtenus dans 9 analyses d'un échantillon de ADN de thymus de veau sont rapportés dans le tableau n° 61.

Tableau n° 61

Etude des bases de ADN de thymus (BDH).

	Guanine	Adénine	Cytosine	Thymine	$\frac{\text{Purines}}{\text{Pyrimidines}}$	$\frac{A + T}{G + C}$
					$\frac{A + G}{T + C}$	
	0,785	1	0,69	1	1,05	1,35
	0,79	1	0,72	0,99	1,04	1,32
	0,83	1	0,73	1,05	1,03	1,31
	0,81	1	0,71	1	1,06	1,31
	0,78	1	0,72	0,98	0,99	1,32
	0,81	1	0,69	1,06	1,03	1,37
	0,83	1	0,65	0,97	1,13	1,33
	0,83	1	0,62	0,93	1,18	1,33
	0,80	1	0,68	1,02	1,06	1,36
Moyenne	0,81	1	0,69	1,00	1,06	1,33
$\pm \sigma$	0,02		$\pm 0,03$	$\pm 0,04$	$\pm 0,05$	$\pm 0,02$

Il est habituel de calculer le rapport :

$$\frac{\text{Adénine} + \text{Thymine}}{\text{Guanine} + \text{Cytosine}} = \frac{A + T}{G + C}$$

(Chargaff - 50, Vendrely - 299, Yi Yong Lee et coll - 327) ce qui a permis à (50) d'établir une classification des différents ADN suivant leur origine, en types AT, GC et intermédiaire d'après la valeur du rapport $A + T / G + C$.

Nous trouvons une valeur moyenne de 1,33, comprise entre les limites de 1,27 et 1,40 indiquées par Chargaff pour l'ADN de thymus de veau.

Le rapport N/P, que nous avons déterminé directement, a été trouvé égal à 1,77, en accord avec la valeur de 1,69 calculée d'après la répartition des différentes bases.

b) Etude comparative des acides nucléiques de E.coli N, SA 5 et SA 10.

ARN et ADN sont extraits séparément par la méthode de Schmidt et Thannhauser, puis purifiés et hydrolysés suivant la technique indiquée page 114.

Les tableaux n° 62 et n° 63 rassemblent les résultats obtenus au cours de différentes analyses complètes.

En ce qui concerne le dosage des bases de ARN, la technique que nous avons suivie est passible de la critique énoncée page 113 ; nous trouvons un rapport bases puriques/bases pyrimidiques de 1,76 alors que Belozerski, cité par Vendrely (299) trouve 1,31 et Chargaff (50) rapporte une valeur de 1,20. Cependant, il s'agissait pour nous, de faire une comparaison entre les bases de ARN extrait de nos différentes souches et non d'indiquer les valeurs absolues de ces bases, aussi nous pensons que nos résultats conservent leur valeur.

Tableau n° 62
Etude des bases de ARN de E.coli.

Guanine	Adénine	Cytosine	Uracile	<u>Purines</u> <u>Pyrimidines</u> $\frac{A + G}{C + U}$
<u>E.coli N</u>				
1,42	1	0,80	0,73	1,58
1,61	1	0,65	0,63	2,04
1,20	1	0,59	0,77	1,62
1,55	1	0,50	0,90	1,82
1,20	1	0,61	0,64	1,76
Moy. $\pm \sigma$ 1,40 $\pm$ 0,19	1	0,62 $\pm$ 0,11	0,73 $\pm$ 0,11	1,76 $\pm$ 0,18
<u>E.coli SA 5</u>				
1,33	1	0,52	0,60	2,08
1,38	1	0,50	0,67	2,04
1,18	1	0,57	0,70	1,72
1,21	1	0,60	0,67	1,74
Moy. $\pm \sigma$ 1,27 $\pm$ 0,09	1	0,55 $\pm$ 0,04	0,66 $\pm$ 0,04	1,89 $\pm$ 0,19
<u>E.coli SA 10</u>				
1,73	1	0,77	0,69	1,90
1,60	1	0,88	0,91	1,45
1,42	1	0,51	0,59	2,20
1,26	1	0,59	0,63	1,85
1,23	1	0,54	0,80	1,67
1,49	1	0,37	0,80	2,13
1,20	1	0,58	0,69	1,73
Moy. $\pm \sigma$ 1,42 $\pm$ 0,20	1	0,60 $\pm$ 0,17	0,73 $\pm$ 0,12	1,85 $\pm$ 0,26

Tableau n° 63
Etude des bases de ADN de E.coli.

Guanine	Adénine	Cytosine	Thymine	$\frac{\text{Purines}}{\text{Pyrimidines}}$ $\frac{A + G}{C + T}$	$\frac{A + T}{G + C}$
<u>E.coli N</u>					
0,94	1	1	0,92	1,01	0,99
0,98	1	0,98	0,85	1,07	0,94
0,95	1	0,82	0,91	1,12	1,08
0,99	1	0,92	0,97	1,05	1,03
Moy. $\pm \sigma$ 0,96 $\pm$ 0,02	1	0,93 $\pm$ 0,08	0,91 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,04	1,01 $\pm$ 0,05
<u>E.coli SA 5</u>					
0,99	1	1,01	0,92	1,03	0,94
1,02	1	1,00	1,00	1,00	1,00
0,73	1	0,87	0,64	1,15	1,02
0,76	1	0,96	0,80	1	1,05
Moy. $\pm \sigma$ 0,88 $\pm$ 0,15	1	0,96 $\pm$ 0,06	0,84 $\pm$ 0,19	1,04 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,04
<u>E.coli SA 10</u>					
1,05	1	1,04	1,03	0,99	0,98
0,99	1	1,07	1,35	0,82	1,14
0,78	1	1	0,86	0,96	1,04
1,02	1	0,98	0,89	1,08	0,95
0,89	1	1,01	0,92	0,98	1,01
Moy. $\pm \sigma$ 0,95 $\pm$ 0,11	1	1,02 $\pm$ 0,03	0,97 $\pm$ 0,20	0,97 $\pm$ 0,09	1,02 $\pm$ 0,07

Les résultats rassemblés dans le tableau n° 62 montrent que les valeurs moyennes de guanine, cytosine et uracile rapportées à l'adénine prise pour unité, ne diffèrent pas d'une façon significative suivant l'origine de ARN ; les rapports bases puriques/bases pyrimidiques sont très voisins les uns des autres montrant bien que les variations peuvent être attribuées à l'imprécision des méthodes.

Le tableau n° 63 rassemble les résultats obtenus avec ADN. Nous ne constatons pas de différences significatives suivant l'origine de ADN ; les rapports $A + T/G + C$ sont très voisins de 1 et classent E.coli dans le type intermédiaire, résultat obtenu par de nombreux auteurs, ce qui confirme la validité des chiffres que nous avons obtenus ; le rapport bases puriques/bases pyrimidiques est également voisin de 1.

En conclusion, l'étude de la répartition des bases dans les acides nucléique de E.coli sensible et résistant à la sulfanilamide ne nous a pas permis de mettre en évidence des différences dans leur composition. Nous pouvions espérer une modification de ADN par interférence de la sulfanilamide dans le métabolisme de la thymine ; il n'en est rien. D'autre part, l'hérédité de la sulfamidorésistance des souches SA 5 et SA 10 implique son inscription dans les gènes, donc dans ADN ; mais il suffit probablement d'une variation minime non décelable par des méthodes chimiques, ou peut-être tout simplement d'une modification de structure de la molécule d'ADN, pour rendre compte d'un caractère nouveau.

C - ESSAIS D'INDUCTION DE RESISTANCE A LA SULFANILAMIDE DE E.COLI SENSIBLE A L'AIDE D'ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE EX-TRAIT D'UNE SOUCHE DE E.COLI RESISTANTE.

A la suite des travaux de Griffith (111) qui obtint, in vivo, la transformation du type R en type S chez des pneumocoques, Avery et coll (8) réussirent, in vitro, à modifier des caractères héréditaires de pneumocoques en les cultivant en présence d'un ADN extrait de souches d'un type différent ; de nombreux auteurs ont tenté des expériences du même genre avec des suc-
cès divers (183-29-288-7-75-2-14-132-256).

En ce qui concerne les sulfamides, l'induction de la sulfamidorésistance n'a été tentée que rarement ; elle aurait été réussie par Hotchkiss et Marmur (132) chez des pneumocoques mais Wyss (325) n'a obtenu que des résultats inconstants avec E.coli. Il faut remarquer que les essais d'induction réalisés avec succès ont porté sur *Pneumococcus* ou *Hemophilus* et les antibiotiques utilisés, pénicilline ou streptomycine, sont doués d'un certain pouvoir muta-
gène qui pourrait expliquer les résultats.

Nous avons tenté d'induire une sulfamidorésistance chez E.coli, en le cultivant en présence de nucléoprotéines extraites de E.coli SA 10. L'extraction de ces nucléoprotéines demande des soins particuliers pour éviter une dégradation de l'ADN, qui a été reconnu être le principe inducteur des transformations, puisque l'addition de désoxyribonucléase supprime l'action trans-
formante de l'ADN en le dégradant.

Le mécanisme de cette induction est encore obscur : on ignore si ADN fourni s'incorpore dans les gènes de la bactérie réceptrice ou s'il est utilisé comme moule sur lequel vient se synthétiser le nouvel ADN. La pénétration de la nucléoprotéine inductrice intacte dans la cellule réceptrice pose égale-
ment un problème.

Cependant l'absence de dégradation des nucléoprotéines lors de leur extraction semble indispensable pour obtenir un ADN actif ; de nombreuses techniques ont été proposées mais aucune méthode générale ne semble valable et chaque microorganisme présente un cas particulier.

Sevag et coll (268) proposèrent plusieurs méthodes applicables à *Streptococcus pyogenes* : après destruction des cellules par différents moyens (ultra-
sons - congélation et décongélation brusque suivies d'un broyage à basse température dans un moulin à billes), les nucléoprotéines sont précipitées par HCl 0,1 N puis déprotéinisées par agitation avec un mélange de chloro-
forme et alcool octylique.

Thompson et Dubos (289) extraient les acides nucléiques du *Pneumocoque* après autolyse spontanée à 37° ; Boivin et coll (27) effectuent une autolyse à 37° en présence de toluène puis isolent les nucléoprotéines par précipitation à pH 4 en présence d'acide acétique. La fraction protéique est ensuite éli-
minée par digestion pepsique et l'acide nucléique isolé à l'état pur par pré-
cipitations fractionnées à l'aide d'alcool additionné d'acide chlorhydrique.

Avery et coll (8) réussirent à isoler du *Pneumocoque* un ADN hautement polymérisé en opérant sur des organismes lysés par du désoxycholate de so-
dium en présence de citrate de sodium, inhibiteur des nucléases ; cette même technique est utilisée par Zamenhof et coll (332) avec *Hemophilus influenzae* et *Serratia marcescens* (331).

La méthode proposée par Mirsky et Pollister (208) utilisant le chlorure de sodium, ne s'appliquant pas à E.coli, Vendrely (296) emploie une hydro-
lyse à la soude et plus récemment obtient ADN avec un bon rendement en utilisant le lysozyme (298).

D'autres techniques ont été proposées par Petrick (231), Chargaff et coll (48-49), Gandelman et coll (101), Koenig et coll (154), Jones (139), Frisch (99). Actuellement, il ne semble pas exister de méthode à l'abri des critiques ; ainsi que le montre Frick (98), même les méthodes les plus douces peuvent livrer un ADN plus ou moins dépolymérisé.

Nous avons tout d'abord cherché à détruire les cellules de *E. coli* en alternant des congélations et réchauffements brusques : nous sommes partis d'une suspension épaisse de *E. coli* SA 10 venant d'une culture réalisée en milieu non sulfamidé, de façon à éviter que des traces de sulfanilamide ne viennent souiller les nucléoprotéines extraites : 46 g de *E. coli* SA 10 pesés à l'état humide, sont mis en suspension dans 100 ml de solution contenant 8,5 g de chlorure de sodium et 1 g de citrate de sodium par litre, ce dernier produit ajouté en raison de son action inhibitrice sur les nucléases. Cette suspension épaisse est versée goutte à goutte dans un récipient en cuivre plongeant dans de l'azote liquide : la congélation est immédiate. Le récipient est ensuite porté dans un bain d'eau à 50° jusqu'à liquéfaction ; l'opération est répétée 4 fois puis la suspension est centrifugée 20 minutes à 15 000 t/mn. Nous obtenons 40 ml d'un liquide jaune qui donne une réaction très positive à l'orcinol ; le culot bactérien est remis en suspension dans 220 ml de solution ClNa-citrate de sodium additionnée de 6 ml de toluène et le mélange est abandonné 40 heures à 37° en flacon hermétiquement bouché pour réaliser une autolyse selon Boivin et Mesrobian (26). Après centrifugation, nous obtenons un liquide qui renferme une importante partie des acides nucléiques bactériens.

Les deux solutions extractives ainsi obtenues sont mélangées : elles contiennent les acides nucléiques sous forme de nucléoprotéines et il est nécessaire d'éliminer la fraction protéique. Nous utilisons la technique indiquée par Sevag (267) : une émulsion est réalisée rapidement au mixer avec 0,2 vol. de chloroforme et 0,06 vol. d'alcool amylique puis nous centrifugeons à basse température ; ce traitement répété jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de pellicule protéique à la séparation des deux phases liquides (10 opérations successives environ), nous donne finalement 110 ml d'une solution des acides nucléiques de *E. coli* SA 10. Nous la concentrons sous vide à 37° jusqu'à obtenir un volume de 25 ml puis nous la filtrons sur bougie Chamberland L 3 et nous la conservons à + 4°C.

La réaction à la diphenylamine pratiquée sur cette solution nous indique qu'elle est très riche en ADN.

Les essais d'induction sont réalisés de la façon suivante : 10 ml de milieu normal sont additionnés de 0,5 ml de la solution d'acides nucléiques puis inoculés avec *E. coli* N. Après 24 heures de croissance, nous testons la culture en milieu sulfamidé à 2 et à 5 g/l. Après 16 passages ainsi réalisés, nous n'avons pu constater aucune diminution de la sensibilité de *E. coli* N vis à vis de la sulfanilamide, la souche continuant à présenter une courbe de croissance identique à celle de la souche originelle.

Nous avons également essayé d'induire une sulfamidorésistance chez une souche de *E. coli* PAB (-) en opérant dans les mêmes conditions, avec les acides nucléiques isolés de *E. coli* SA 10 ; les essais se sont montrés également négatifs, la souche n'acquiert pas de sulfamidorésistance mais conserve son caractère PAB (-). Nous avons d'ailleurs pu vérifier à cette occasion, que les acides nucléiques fournis dans le milieu de culture, stimulent la croissance de ce mutant PAB (-).

Néanmoins, il est difficile d'affirmer que l'induction de la sulfamido-résistance chez E.coli par un ADN isolé d'une souche résistante, est impossible car l'isolement de l'ADN est très délicat et sa dépolymérisation toujours à craindre.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Nous nous étions proposés de comparer une souche de *Escherichia coli* sensible à la sulfanilamide et des souches dérivées rendues résistantes.

Dans l'introduction, nous avons signalé les différents procédés utilisés pour obtenir des souches bactériennes résistantes aux drogues et nous avons rappelé les deux grandes théories proposées par les auteurs : sélection de variants, spontanés ou provoqués, ou adaptation progressive de l'ensemble d'une population bactérienne.

L'étude des modifications physiques ou chimiques accompagnant la résistance a été abordée par de nombreux auteurs mais les résultats acquis ne sont valables que dans certains cas bien particuliers ; ces études ont cependant conduit à la notion d'antimétabolites, après la mise en évidence de l'action antisulfamide du PAB.

Nous avons consacré un paragraphe à l'étude du mode d'action des sulfamides et à la sulfamidorésistance ; le rôle du PAB n'a pu être mis en évidence dans tous les cas bien que ce métabolite semble impliqué dans la synthèse de l'acide folique qui contrôle de nombreuses synthèses conduisant à des métabolites indispensables à la vie et à la multiplication des micro-organismes.

Dans le chapitre I nous avons défini les caractères de la souche de *Escherichia coli* utilisée, le milieu de culture et les techniques employées pour assurer une croissance régulière et pour la mesurer ; nous avons montré que la mesure de la densité optique, méthode très rapide et pratique, concorde avec le dosage de l'azote total bactérien ou la détermination du poids sec, dans des limites que nous avons précisées.

Dans le chapitre II nous avons indiqué le protocole suivi pour obtenir des souches sulfamidorésistantes (méthode des subcultures) et nous avons montré que la résistance acquise est stable durant de nombreuses générations, même en absence de sulfanilamide ; cette résistance se manifeste vis à vis de différents sulfamides, compte tenu de leur activité bactériostatique propre.

Dans le chapitre III nous avons comparé la croissance de la souche de *E. coli* sensible et celles des souches rendues résistantes à la sulfanilamide. Après un rappel des théories avancées sur la notion de phase de latence, nous avons montré que, dans nos conditions expérimentales, notre souche de *E. coli* ne présente pas de phase de latence.

Pour cela, nous avons suivi la croissance par des mesures néphélométriques très sensibles et montré qu'elle est d'emblée régulière ; l'utili-

sation du biophotomètre, qui permet l'enregistrement continu de la croissance, a confirmé nos résultats.

La croissance de la souche E.coli SA 5, résistante à 5 g/l de sulfanilamide s'est révélée identique à celle de E.coli N montrant que l'adaptation est excellente. Pour E.coli SA 10, résistante à 10 g/l de sulfanilamide, l'allure de la croissance est identique, mais le temps moyen de génération est plus long, témoignant ainsi d'une adaptation imparfaite ; cependant, pour cette souche, le nombre de bactéries inoculées prend une certaine importance et les inoculats faibles montrent une croissance irrégulière ou nulle ; l'addition d'acides aminés ou de facteurs de croissance, ne nous a pas permis de régulariser la croissance de cette souche dans ces cas.

Nous avons montré qu'en milieu non sulfamidé, les trois souches N, SA 5, SA 10 présentent la même croissance, ce qui montre que les souches résistantes ne sont pas devenues sulfamido-dépendantes.

L'étude de la croissance de E.coli N en présence de différentes doses de sulfanilamide nous a permis de montrer l'action bactériofreinatrice des sulfamides, entraînant une diminution de la vitesse de croissance qui se traduit par une prolifération ralentie mais régulière, ce qui nous a amené à conclure que l'ensemble de la population bactérienne croît en présence de sulfanilamide sans qu'il y ait sélection ou production de mutants sulfamido-résistants.

Nous avons enfin étudié l'influence de l'aération ; elle se manifeste par une croissance plus abondante mais toujours régulière et sans latence, aussi bien pour la souche sensible que pour les souches résistantes.

Dans le chapitre IV nous avons étudié la pénétration de la sulfanilamide dans la cellule de E.coli sensible et résistant, en utilisant un produit radio-actif. Après avoir précisé nos conditions expérimentales, nous avons tout d'abord montré que les bactéries, placées en "resting cells" fixent de la sulfanilamide, qu'elles soient sensibles ou résistantes, à un taux proportionnel à la concentration du milieu environnant.

Pour des bactéries en croissance, la fixation s'effectue suivant un isotherme d'absorption du type Langmuir, sans que nous ayons pu mettre en évidence des différences entre les souches sensibles et les souches résistantes.

L'étude de la répartition de la sulfanilamide dans les bactéries nous a montré une forte fixation par la fraction lipidique, mais les protéines fixent également la drogue, sous une forme non altérée ; ce fait nous a amenés à poser l'hypothèse d'une intégration de la molécule de sulfanilamide dans des molécules complexes, par suite de son analogie structurale avec d'autres métabolites tels le PAB, hypothèse que nous chercherons à vérifier par la suite.

Dans le chapitre V nous avons rapporté nos tentatives de mise en évidence de modifications qui auraient pu apparaître dans le milieu de culture, en rapport avec la sulfamidorésistance. L'étude des variations de l'acidité du milieu de culture (pH et acidité titrable), de la consommation de glucose, en milieu aéré ou non, ne nous a pas permis de mettre en évidence des différences nettes.

La comparaison des besoins en soufre (indispensable à la synthèse d'acides aminés soufrés qui ont un certain pouvoir antisulfamide) et en azote (indispensable à la synthèse protéique) ne nous a révélé aucune différence entre la souche sensible et les souches résistantes. La molécule de sulfanilamide d'autre part, n'est pas dégradée par les bactéries résistantes pour être utilisée comme source de S ou de N lors d'une carence de ces éléments dans le milieu extérieur.

Nous avons recherché la présence de PAB dans le milieu de culture des souches résistantes ; les dosages effectués par voie microbiologique avec un mutant PAB (-), nous ont montré que la quantité de PAB, ou d'un produit à activité similaire, est du même ordre pour la souche sensible et les souches résistantes et par conséquent il est peu vraisemblable que la résistance à la sulfanilamide soit due à une synthèse accrue de substances douées d'activité antisulfamide libérables dans le milieu de culture.

Dans le chapitre VI nous avons exposé nos recherches de différences, non plus dans le milieu extérieur mais dans les bactéries elles-mêmes, en étudiant particulièrement la composition des protéines en acides aminés et le métabolisme des acides nucléiques.

L'étude des acides aminés des protéines, réalisée par chromatographie sur papier, ne nous a pas révélé de différences qualitative ou quantitative entre la souche sensible et les souches résistantes.

L'étude des acides nucléiques nous a retenu plus longtemps du fait du rôle important qui leur est attribué.

Après avoir exposé les différentes techniques utilisées par les auteurs et par nous mêmes pour les extraire et les doser, nous avons tout d'abord étudié la teneur des bactéries sensibles et sulfamidorésistantes dans différentes conditions expérimentales :

L'analyse statistique des résultats obtenus en fin de croissance logarithmique, fait apparaître des différences qui ne sont pas toujours significatives, ce qui nous a conduit à une interprétation prudente : les bactéries résistantes à la sulfanilamide renferment en général moins d'ADN que les bactéries sensibles ; ceci pourrait être dû à un manque de thymine, lui-même imputable à un défaut de synthèse d'acide folique par suite de la substitution de la sulfanilamide au PAB. Cette synthèse déficiente de l'ADN entraînerait une multiplication plus lente des souches résistantes, particulièrement nette pour *E. coli* SA 10.

Nous avons ensuite suivi l'évolution des acides nucléiques durant la croissance bactérienne ; les résultats obtenus, en accord avec de nombreux auteurs, nous ont montré une accumulation d'ARN au début de la croissance, alors que ADN reste à un taux sensiblement constant durant toute la croissance. Cette accumulation d'ARN est généralement considérée comme caractéristique de la phase de latence ; or nous avons montré au chapitre III que dans nos conditions expérimentales, nous n'observions pas de phase de latence et il semble possible d'envisager la synthèse d'un ARN non fonctionnel, dû à un métabolisme très actif des bactéries placées dans un milieu neuf, phénomène que nous avons pu montrer de façon plus nette en réalisant des inoculats abondants.

Enfin l'étude du métabolisme des acides nucléiques chez les souches résistantes cultivées en milieu non sulfamidé nous a montré que les perturbations observées disparaissaient bien que la résistance soit conservée.

Ceci nous a amené à étudier comparativement la composition des acides nucléiques de *E. coli* sensible et résistant à la sulfanilamide, pensant trouver des différences qui pourraient expliquer le maintien de la sulfamidorésistance par une modification de ADN dont le rôle dans la transmission des caractères est connu.

Les résultats obtenus dans le dosage d'ARN ne nous ont pas montré de différences entre les souches sensibles et résistantes. Pour ADN, nous avons trouvé une composition analogue dans les différentes souches et il ne semble

pas que la sulfamidorésistance retentisse sur les bases puriques et pyrimidiques qui entrent dans la molécule d'ADN ; cependant il pourrait suffire d'un simple déplacement d'une molécule de base, modification non décelable par des méthodes chimiques, pour changer notablement les propriétés physiologiques de ADN.

Nous avons ensuite tenté, sans succès, d'induire une sulfamidorésistance chez *E.coli* sensible en le cultivant en présence d'ADN extrait d'une souche de *E.coli* résistante à la sulfanilamide.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ALBAUM H.G., UMBREIT W.W. - J. Biol. Chem. 1947, 167, 369-76.- Differentiation between ribose-3-phosphate and ribose-5-phosphate by means of the orcinol-pentose reaction.
- (2) ALEXANDER M.E., LEIDY F. - J. Exper. Med. 1951, 93, 345-59.- Determination of inherited traits of H.influenzae by desoxyribonucleic acid fractions isolated from type-specific cells.
- (3) ALIMCHANDANI H.R., SREENIVASAN A. - J. Bact. 1957, 74, 175 - 79. - Studies on the accumulation of 4-amino 5-imidazole carboxamide in Escherichia coli.
- (4) ALIMCHANDANI H.R., SREENIVASAN A. - Proc. Indian. Acad. Sci. Sect. B 1957, 45, 27-31. - Reversal by folic acid of penicillin action on growth and on pentose nucleic acid synthesis in Lactobacillus casei.
- (5) ANDERSON R.F., RHODES R.A., NELSON G.E.N., SHEKLETON M.C., BARRETO A., ARNOLD M. - J. Bact. 1958, 76, 131-36. - Lysine, methionine and tryptophan content of microorganisms/I.Bacteria.
- (6) ARONSON A.I., SPIEGELMAN S. - Biochem. Biophys. Acta. 1958, 29, 214-15. - On the use of chloramphenicol-inhibited systems for investigating RNA and protein synthesis.
- (7) AUSTRIAN R., Mc LEOD C.M. - J. Exper. Med. 1949, 89, 451-60.- Acquisition of M protein by pneumococci through transformation reactions.
- (8) AVERY O.T., Mc LEOD C.M., Mc CARTY M. - J. Exper. Med. 1944, 79, 137-57. - Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types.
- (9) BABIN R., DELMON G., BLANQUET F. - Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 1955, 91, 208-10. - Microdosage des pentoses.
- (10) BAKAY B., KIRSCHNER L., TOENNIES G. - Arch. Biochem. Biophys. 1956, 65, 500-12. - The determination of nucleic acids by their reactions with cysteine and sulfuric acid.
- (11) BANERJEA A. - Ann. Bioch. Exp. Med. 1957, 17, 199-202. - Variations in protein and aminoacid contents between smooth and rough forms of certain serotypes of E.coli and their relation to DNA contents.
- (12) BARRENSCHEEN H., PEHAM A. - Z. physiol. Chem. 1941, 272, 81-86. - Zur photometrischen Bestimmung der Nucleoside und Nucleotide auf Grund der Orcinreaktion.
- (13) BASKETT A.B. - Proc. Roy. Soc. B. 1952, 139, 251-62. - The resistance of Bact.lactis aerogenes to proflavine. II. The direct induction of adaptation.
- (14) BELJANSKI M. - Thèse Sci. Nat. Paris. 1951, n° 3370. - Etude des souches bactériennes résistantes à des antibiotiques. Comparaison avec des souches sensibles de mêmes espèces.

- (15) BELJANSKI M. - Ann. Inst. Pasteur. 1952, 83, 81-101. - Comparaison de souches bactériennes résistantes à des antibiotiques avec des souches sensibles de même espèce.
- (16) BELJANSKI M. - Ann. Inst. Pasteur. 1953, 84, 402-409. - Comparaison de souches bactériennes résistantes à des antibiotiques avec des souches sensibles de même espèce. II. Cas de la pénicilline.
- (17) BELJANSKI M. - Ann. Inst. Pasteur. 1953, 85, 463-69. - Etude des acides nucléiques de souches bactériennes résistantes à la streptomycine et de souches de mêmes espèces mais sensibles à l'antibiotique.
- (18) BELJANSKI M., GRUMBACH F. - C.R. Acad. Sci. 1955, 236, 2111-14. - Etude biochimique d'une souche de *Mycobacterium tuberculosis* streptomycino-sensible et d'une souche streptomycino-résistante.
- (19) BELL P.H., ROBLIN R.O. - J. Am. Chem. Soc. 1942, 64, 2905-17. - Studies in chemotherapy. VII - A theory of the relation of structure to activity of sulfanilamide type compounds.
- (20) BELORZERSKY A.N. - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1947, 12, 1-6. - On the nucleoproteins and polynucleotides of certain bacteria.
- (21) BELORZERSKY A.N., ASEEVA I.V., MOROZ A.F., - Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R. 1956, 109, 149-51. - Etude comparative de la teneur en acides nucléiques des cultures de certaines bactéries sensibles ou résistantes à la grisémine et à la streptomycine. (in Bull. Signal. 1957. 113 607).
- (22) BEN ISHAI R., VOLCANI B.E., BERGMANN E.D. - Experientia 1951, 7, 63-64. - The synthesis of the purine nucleus by *Escherichia coli*, a study on the mode of action of sulfa-drugs.
- (23) BEN ISHAI R. - Biochem. Biophys. Acta. 1957, 26, 477-83. - Dependence of protein synthesis on ribonucleic acid synthesis. II - Non participation of preformed ribonucleic acid in protein synthesis.
- (24) BERGMANN E.D., BEN ISHAI R., VOLCANI B.E. - J. Biol. Chem. 1952, 194, 521-29. - Effect of methyl donors on 4-amino 5-imidazole carboxamide in *Escherichia coli*.
- (25) BLASS J., LECOMPTE O., MACHEBOEUF M. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 1552-55. - Recherches sur les acides aminés libres de *Vibrio cholerae* par microchromatographie.
- (26) BOIVIN A., MESROBEANU L. - C.R. Soc. Biol. 1933, 112, 611-13. - Contribution à l'étude de la composition chimique des bactéries. Les substances phosphorées au cours de l'autolyse bactérienne.
- (27) BOIVIN A., DELAUNAY A., SAREIRON R., LEHOULT Y. - Rev. Immunol. 1942, 7, 124-33. - Les autolysats bactériens. Méthode générale pour la séparation de leurs constituants biologiquement actifs.
- (28) BOIVIN A., VENDRELY R. - C.R. Soc. Biol. 1943, 137, 432. - Les nucléoprotéides, constituants des cellules bactériennes.
- (29) BOIVIN A. - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1947, 12, 7-17. - Directed mutation in colon bacilli, by an inducing principle of desoxy-ribonucleic nature : its meaning for the general biochemistry of heredity.
- (30) BOIVIN A., VENDRELY R., TULASNE R. - Arch. Sci. Physiol. 1947, 1, 35-47. - Rôle des acides nucléiques dans la vie cellulaire.
- (31) BOLLE A. - Ann. Inst. Past. 1955, 88, 258-60. - Comparaison d'une souche sensible (*Staphylococcus aureus*. Londres) avec une souche résistante (*Staphylococcus* "Leg") aux antibiotiques.
- (32) BONDT J., GILLELAND J.L. - Arch. Biochem. Biophys. 1955, 58, 189-93. - The influence of some polycyclic hydrocarbons on the nucleic acid concentrations in *E.coli*.
- (33) BONET-MAURY P. - Bull. Acad. Med. 1947, 131, 221-24. - L'enregistrement photométrique du mode d'action des antibiotiques.

- (34) BONNEL P.H. - Ann. Biol. Clin. 1951, 9, 410-14. - Obturation des tubes de milieu de culture au moyen d'une capsule en aluminium.
- (35) BOREK E., ROCKENBACH J., RYAN A. - J. Bact. 1956, 71, 318-23. - Studies on a mutant of *Escherichia coli* with unbalanced ribonucleic acid synthesis.
- (36) BOREK E., RYAN A. - J. Bact. 1958, 75, 72-76. - Studies on a mutant of *Escherichia coli* with unbalanced ribonucleic acid synthesis. The concomitance of ribonucleic acid synthesis with resumed protein synthesis.
- (37) BOULANGER P., MONTREUIL J. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 784-90, 791-99. - Etudes sur les acides nucléiques.
- (38) BOULANGER P., MONTREUIL J. - Bull. Soc. Chim. Fr. 1952, 844-52. - Constituants des acides nucléiques.
- (39) BRACHET J. - Actualités biochimiques n° 16, 1952, L. Masson. Paris. - Le rôle des acides nucléiques dans la vie de la cellule et de l'embryon.
- (39^b) BRATTON A.C., MARSHALL E.K. - J. Biol. Chem. 1939, 128, 537-50. - A new coupling component for sulfanilamide determination.
- (40) BRECHBUHLER T. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1950, 32, 952-58. - Etudes sur les acides nucléiques des bactéries. Teneur des souches R et S de *Salmonella paratyphi* A et de *Shigella dysenteriae* en acides pentose et desoxypentose-nucléiques au cours de leur croissance.
- (41) BRYSON V., SZYBALSKI W. - Science. 1952, 116, 45-46. - Microbial selection.
- (42) BURR W.W., DUNKELBERGER C., Mc PHERSON J.C., TIDWELL H.C. - J. Biol. Chem. 1954, 210, 531-37. - Blood levels of absorbed labeled fat and chylomicronemia.
- (43) CALDWELL P.C., HINSHELWOOD C.N. - J. Chem. Soc. 1950, 1415 - 18. - The nucleic acid content of *B. lactis aerogenes*.
- (44) CALVIN M., HEIDELBERGER C., REID J., TOLBERT B., YANKWICH P. - Isotopic Carbon. 1949, John Wiley. New-York.
- (45) CAVALLI L.L. - Croissance microbienne et facteurs d'inhibition 1952, OMS, Genève. - Genetic analysis of drug resistance. p.185-205.
- (46) CERIOTTI A. - J. Biol. Chem. 1952, 198, 297-303. - A microchemical determination of DNA.
- (47) CHAIN E.B., PALADINO S., CALLOW D.S., UGOLINI F., VAN DER SLINS J. - Croissance microbienne et facteurs d'inhibition, 1952, OMS Genève. - Studies on aeration. p.73-97.
- (48) CHARGAFF E., ZAMENHOF S. - J. Biol. Chem. 1948, 173, 327-35. - The isolation of highly polymerized desoxypentosenucleic acid from yeast cells.
- (49) CHARGAFF E., SAIDEL H.F. - J. Biol. Chem. 1949, 177, 417-38. - On the nucleoproteins of avian tubercle bacilli.
- (50) CHARGAFF E. - The nucleic acids. 1955, 1, 307-72. Acad. Press. New-York. - Isolation and composition of deoxypentose nucleic acids.
- (51) CHARGAFF E., DAVIDSON J.N. - The Nucleic acids 2 vol. 1955. Acad. Press. New-York.
- (52) CHIBNALL A.C. - Brit. Med. Bull. 1954, 10, 183-86. - Quantitative determination of amino acids.
- (53) Ciba Foundation Symposium on Drug Resistance in microorganisms. 1957, J et A Churchill. Londres.
- (54) CLAYTON R.A., STRONG F.M. - Analyt. Chem. 1954, 26, 1362-64. - New solvent system for separation of amino acids by paper chromatography.
- (55) COHEN S.S., CHARGAFF E. - J. Biol. Chem. 1944, 156, 691-704. - Studies on composition of *Rickettsia prowazeki*.
- (56) COOPER P.D., ROWLEY D. - Nature 1949, 163, 480-81. - Investigations with radioactive penicillin.

- (57) COOPER P.D., ROWLEY D. - Nature. 1949, 164, 842-43. - Location of radioactive penicillin in *Staphylococcus aureus* after contact with the drug.
- (58) COOPER P.D. - Bact. Rev. 1956, 20, 28-48. - Site of action of radio-penicillin.
- (59) COWGILL R.W., PARDEE A.B. - Experiments in biochemical research techniques. 1957. John Wiley. New-York.
- (60) COWIE D.B., BOLTON E.T., SANDS M.K. - J. Bact. 1950, 60, 233-48. - Sulphur metabolism in *Escherichia coli*. I. Sulfate metabolism of normal and mutant cells.
- (61) CROSBIE G.W., SMELLIE R.M.S., DAVIDSON J.N. - Biochem. J. 1953, 54, 287-92. - Phosphorus compounds in the cell. V. The composition of the cytoplasmic and nuclear ribonucleic acids of the liver cell.
- (62) DAGLEY S., DAWES E.A., MORRISON G.A. - Nature. 1950, 164, 437-38. - Production of aminoacids in synthetic media by *Escherichia coli* and *Aerobacter aerogenes*.
- (63) DAGLEY S., DAWES E.A., MORRISON G.A. - J. Bact. 1951, 61, 433-41. - The effect of aeration on the growth of *Aerobacter aerogenes* and *Escherichia coli* with the reference to the Pasteur mechanism.
- (64) DAGLEY S., JOHNSON A.R. - Arch. Biochem. Biophys. 1956, 21, 270-76. - Appearance of aminoacids and peptides in culture filtrates of micro-organisms growing in mineral salt medium.
- (65) DAVID R. - Thèse. Sci. Nat. Paris 1931. - Contribution à l'étude numérique de la multiplication du bacille pyocyanique dans différents milieux de culture liquides. Influence de la teneur des milieux en certains éléments nutritifs.
- (66) DAVIDSON J.N., WAYMOUTH C. - Biochem. J. 1944, 38, 379-85. - Tissues nucleic acids : nucleic acid and nucleotide content of liver tissue.
- (67) DAVIDSON J.N., SMELLIE R.M.S. - Biochem. J. 1952, 52, 594-99. - Phosphorus compounds in the cell. II. The separation by ionophoresis on paper of the constituent nucleotides of ribonucleic acid.
- (68) DEAN A.C.R., HINSHELWOOD C.N. - Proc. Roy. Soc. B. 1952, 140, 339-52. - Colony formation by *Bact. lactis aerogenes* on solid media containig antibacterial agents.
- (69) DE LEY J. - Arch. Biochem. 1949, 20, 251-55. - The respiration of nitrogen deficient bacteria.
- (70) DELMON F., BABIN R., BLANQUET P. - Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 1953, 91, 211-13. - Microdosage des désoxypentoses.
- (71) DEMEREC M. - J. Bact. 1948, 56, 63-74. - Origin of bacterial resistance to antibiotics.
- (72) DENT C.E. - Biochem. J. 1948, 48, 169-80. - A study of the behaviour of some sixty amino-acids and other ninhydrin-reacting substances on phenol-collidine filter paper chromatograms, with notes as to the occurrence of some of them in biological fluids.
- (73) DERIAZ R.E., STACEY M., TEECE E.G., WIGGINS L.F. - J. Chem. Soc. 1949, 1222-32. - Deoxy-sugars. Part I. The Dische reaction for 2-deoxypentoses.
- (74) DEYRUP I.J. - J. Gen. Physiol. 1955, 56, 39, 893-908. - Further observations on uptake of S35 labelled sulfate by renal tissue in vitro.
- (75) DIANZANI M.U. - Experientia, 1950, 6, 332-34. - Mutations dans l'équipement enzymatique de *E.coli* et *Proteus X 19*, dirigées par l'acide désoxyribonucléique isolé de bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes.
- (76) DI CARLO F.J., SCHULTZ A.S. - Arch. Biochem. 1948, 17, 293-300. - Yeast nucleic acid. Quantitative determination by spectrophotometry. Ammonium and phosphate ions as factors in biosynthesis.

- (77) DISCHE Z. - Mikrochemie, 1930, 8, 4-32. - Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen.
- (78) DOBROWOLSKA H., JUNGERMAN D., POGONOWSKA J. - Med. Doświadczalna i Mikrobiol. 1954, 6, 281-92. (in Chem. Abs. 49, 430 c). - Streptomycin-induced changes in several *Shigella* strains.
- (79) DRASHER M.L. - Science. 1953, 118, 182-82. - A criticism of the indiscriminate use of the Schmidt-Thannhauser method for the fractionation of nucleic acids in biological material.
- (80) DUMAZERT C., MARCELET C. - C.R. Soc. Biol. 1937, 126, 945-47. - Sur le microdosage de l'azote urinaire par la méthode de Kjeldahl et sur le "reste azoté urinaire" de Mestrezat-Janet.
- (81) DURANT J.A. - Am. J. Clin. Path. 1955, 25, 1094-95. - A simple R, calculator for paper strip chromatograms.
- (82) EAGLE H. - J. Exper. Med. 1954, 99, 207-26. - The binding of penicillin in relation to its cytotoxic action. I. Correlation between the penicillin sensitivity and combining activity of intact bacteria and cell-free extracts.
- (83) EAGLE H. - J. Bact. 1954, 68, 610-16. - The multiple mechanisms of penicillin resistance.
- (84) EAGLE H. - in Ciba Found. Symp. on Drug resistance in microorganisms. p.180-81. J et A Churchill. 1957. Londres.
- (85) EHRLICH P. - Ber. dtsch. chem. Ges. 1909, 42, 17. - Über den jetzigen Stand der Chemotherapie.
- (86) EHRWEIN A. - Thèse Pharm. Nancy. 1950. - Effets de l'association synergique du phénol et du sulfamide sur le métabolisme carboné et azoté de *Escherichia coli*.
- (87) ELDJARN L., NYGAARD O. - Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1954, 6, 160-67. - Comments on methods in biological works with S³⁵ labelled compounds.
- (88) EMERSON S. - J. Bact. 1947, 54, 195-207. - Growth responses of a sulfonamide requiring mutant strain of *Neurospora*.
- (89) ERICHSEN L.V., MULLER R. - Angew. Chem. 1952, 64, 580-85. - Methodik des Arbeitens mit dem radioactiven Schwefel-isotop S³⁵.
- (90) ERICKSEN K.R. - Acta Path. Microbiol. Scand. 1949, 26, 269. - Studies on the mode of origin of penicillin-resistant staphylococci.
- (91) ERICKSEN K.R. - Acta Path. Microbiol. Scand. 1953, 32, 393-401. - On the validity of the fluctuation test in studies on the mode of origin of penicillin-resistant staphylococci.
- (92) FAGUET M. - Actualités scientifiques et industrielles n° 898, 1941. L. Hermann. Paris. - La photoélectricité dans l'enregistrement de la croissance bactérienne.
- (93) FERNANDEZ R.V., VARELA B.R. - Microbiologia Espanola. 1957, 10, 461-85. - Estudios sobre el metabolismo de los acidos nucleicos de las bacterias.
- (94) FINLAND M., WILCOX C. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1953, 83, 605-8. - Antibiotic combinations and resistance to antibiotics : penicillin with others antibiotics against penicillin-resistant staphylococci.
- (95) FISH C.A., ASIMOV P., WALKER B.S. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1950, 75, 774-76. - Nucleoprotein content during the staphylococcal growth cycle.
- (96) FISKE H., SUBBAROV Y. - J. Biol. Chem. 1925, 66, 375-400. - The colorimetric determination of phosphorus.
- (97) FREELAND J.C., GALE E.F. - Biochem. J. 1947, 41, 135-38. - The aminoacid composition of certain bacteria and yeast.

- (98) FRICK G. - Biochem. Biophys. Acta. 1954, 13, 374-80. - A critical study of some commonly used methods of preparing desoxyribonucleate.
- (99) FRISCH-NIGGEMEYER W. - Enzymologia. 1953, 16, 72-74. - Die Freisetzung hochviskoser desoxyribonukleinsäure aus Bakterien unter dem Einfluss Lysozym.
- (100) GALE E.F., DAVIES R. - Adaptation in microorganisms. 1953. - University Press, Cambridge.
- (101) GANDELMAN B., ZAMENHOFF S., CHARGAFF E. - Biochem. Biophys. Acta. 1952, 9, 399-401. - The desoxypentose nucleic acids of three strains of *Escherichia coli*.
- (102) GANGULI N.C. - Experientia. 1956, 12, 38-39. - Emploi de grandes feuilles de papier filtre dans la chromatographie circulaire par la technique descendante.
- (103) GERARDIN C. - Thèse Pharm. Nancy. 1956. - Sur la résistance au mercure d'une levure (*Candida utilis*). Obtention d'une souche résistante, ses caractères.
- (104) GEZON H.M., FASAN D.M. - Science. 1951, 114, 422-23. - Cross resistance of *Streptococci* to five streptomycetes antibiotics.
- (105) GEZON H.M., COLLINS G.R. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1952, 81, 269-71. - Constant treatment technic for inducing antibiotics resistance in *Streptococci*.
- (106) GOLD N.I., STURGIS S.H. - J. Biol. Chem. 1952, 196, 143-50. - Cytosine-thymine ratios of endometrial desoxypentose nucleic acids.
- (107) GOLDFARB M.M. - Antibiotiki. 1957, 2, 35-37. - Changes in amino-acid composition of *Staphylococci* during development of resistance to penicillin.
- (108) GOTS J.S. - Arch. Biochem. 1950, 29, 222-23. - The accumulation of 4-amino 5-imidazole carboxamide by a purine requiring mutant of *E. coli*.
- (109) GOTS J.S. - Nature. 1953, 172, 256-57. - Occurrence of 4-amino 5-imidazole carboxamide riboside as a pentose derivative.
- (110) GREENBERG G.R. - J. Am. Chem. Soc. 1952, 74, 6307-8. - Isolation of 4-amino 5-imidazole carboxamide riboside from the culture medium of sulfonamide - inhibited *Escherichia coli*.
- (111) GRIFFITH F. - J. Hyg. 1928, 27, 113. - Significance of pneumococcal types.
- (112) GROS F., BELJANSKI M., MACHEBOEUF M. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 1696-1717. - Action de la pénicilline sur le métabolisme de l'acide ribonucléique chez *Staphylococcus aureus*.
- (113) GROS F., GROS F. - Biochem. Biophys. Acta. 1956, 22, 200-201. - Rôle des aminoacides dans la synthèse des acides nucléiques chez *E. coli*.
- (114) GURIN S., HOOD D.B. - J. Biol. Chem. 1939, 131, 211-23. - The identification and estimation of hexoses in polysaccharides and glycoproteins by the carbazole method.
- (115) HACKMAN R.H., LAZARUS M. - Austral. J. Biol. Sci. 1956, 9, 281-92. - Quantitative analysis of aminoacids using paper chromatography.
- (116) HADOT J.J. - Thèse. Pharm. Nancy. 1951. - Modifications apportées à l'action antibiotique des sulfamides par leur association avec divers composés chimiques.
- (117) HAHN F.E., SCHAECHTER M., GEGLOWSKI W.S., HOPPS H.E., CIAK J. - Biochem. Biophys. Acta. 1957, 26, 469-76. - Interrelations between nucleic acid and protein synthesis.
- (118) HANES C.S., ISHERWOOD F.A. - Nature. 1949, 164, 1107-12. - Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram.

- (119) HARRIS J.S., KOHN H.I. - J. Pharmacol. 1941, 73, 385-400. - On the mode of action of the sulfonamides. II. The specific antagonism between methionine and the sulfonamides in *Escherichia coli*.
- (120) HARRIS J.S., KOHN H.I. - J. Biol. Chem. 1941, 141, 989-90. - The effect of purines on the action of sulfonamides.
- (121) HARTLES R.L., WILLIAMS R.T. - Biochem. J. 1947, 41, 206. - The metabolism of sulphonamides : IV. The relation of the metabolic fate of AMBAMIDE (Marfanil) and V 335 to their lack of systemic antibacterial activity.
- (122) HAWK P.B., OSER B.L., SUMMERSON W.H. - Practical Physiological Chemistry p.472. 1951. Blakiston company. New-York.
- (123) HENRIGUES F.C., KISTIAKOWSKY G.B., MARGNETTI C., SCHNEIDER W.G. - Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 1946, 18, 349-53. - Radioactives studies. Analytical procedure for measurement of long lived radioactive sulfur with a Lauritzen electroscope and comparison of electroscope with special Geiger counter.
- (124) HENRY R.J. - The mode of action of sulfonamides. Publ. J. Macy. Found. 1944.
- (125) HERRIOTT R.M. - J. Gen. Physiol. 1951, 34, 761-64. - Nucleic acid. synthesis in mustard gas-treated *Escherichia coli* B.
- (126) HINSHELWOOD C.N. - The chemical kinetics of the bacterial cell. 1946. Oxford.
- (127) HINSHELWOOD C.N. - Brit. Med. Bull. 1953, 9, 150-53. - Adaptatives enzymes.
- (128) HINSHELWOOD C.N. - Croissance microbienne et facteurs d'inhibition. OMS. Genève. - Reactions patterns in bacterial metabolism. p.3-18. 1952.
- (129) HOARE D.S. - J. Gen. Microbiol. 1955, 12, 534-39. - The aminoacids composition of *Sarcina lutea* grown in different media.
- (130) HOTCHKISS R.D. - J. Biol. Chem. 1948, 175, 315-32. - The quantitative separation of purines, pyrimidines and nucleosides by paper chromatography.
- (131) HOTCHKISS R.D. - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1951, 16, 457. - Transfer of penicillin-resistance on pneumococci by the desoxy-ribonucleate derived from resistant cultures.
- (132) HOTCHKISS R.D., MARMUR J. - Proc. Natl. Acad. Sci. US. 1954, 40, 55-60. - Double marker transformations as evidence of linked factors in desoxyribonucleate transforming agents.
- (133) HOTCHKISS R.D., EVANS E.H. - Ciba Found. Symp. on Drug resistance in microorganisms.- Sulphonamide resistance in *Pneumococci*. - p.181-93.
- (134) HUME D.N. - Anal. Chem. 1949, 21, 322-26. - Radiochemical activity analysis.
- (135) HURST R.O., MARKO A.M., BUTLER G.C. - J. Biol. Chem. 1953, 204, 847-56. - The mononucleotide content of some desoxyribonucleic acids.
- (136) ISHII K., SEVAG M.G. - Arch. Biochem. Biophys. 1958, 77, 41-49. - Isolation and characterisation of a yellow pigment from *Escherichia coli*.
- (137) IVERSON R.M., GIESE A.C. - Biochem. Biophys. Acta. 1957, 25, 62-68. - Synthesis of nucleic acids in ultraviolet treated *Escherichia coli*.
- (138) JONES A.S. - Biochem. Biophys. Acta. 1953, 10, 607-13. - The isolation of bacterial nucleic acids using cetyltrimethylammonium bromide (Cetavlon).
- (139) JONES A.S., MARSH G.E., RIZVI S. - J. Gen. Microbiol. 1957, 17, 586-95. - The isolation and composition of the nucleic acids of *Aerobacter aerogenes*.

- (140) JOSHI S., SREENIVASAN A. - Proc. Ind. Acad. Sci. 1958, 47, 48-54. - Non acetylation of sulfonamide during acquirement of drug resistance in *Bacillus subtilis*.
- (141) JOSHI S., SREENIVASAN A. - Proc. Ind. Acad. Sci. 1958, 47, 57-69. - Formation of an arylamine by sulfonamide resistant strain of *Bacillus subtilis*.
- (142) KAMEN M.D. - Radioactives tracers in biology. 1951. Academic Press. New-York.
- (143) KANDLER O., ZEHENDER C., MULLER J. - Arch. Mikrobiol. 1956, 24, 219-49. - Vergleichende Untersuchungen über den Nucleinsäuren und Atmungstoff - wechsel von *Proteus vulgaris*, dessen stabiler L-Phase und pleuropneumonie è - ähnlichen organismen.
- (144) KANDLER O., MULLER J., ZEHENDER C. - Archiv. Mikrobiol. 1956, 24, 250-65. - Über Veränderungen des Nucleinsäuren gehaltes von *Proteus vulgaris* während der durch Penicillin ausgelösten Umwandlung in die L Phase.
- (145) KAPLAN-BRILLE A. - Thèse Pharm. Paris. 1931. - Influence du nombre de microbes ensemencés sur la multiplication du bacille pyocyanique dans un milieu de culture liquide.
- (146) KAY E., SIMMONDS N.S., DOUNCE A.L. - J. Am. Chem. Soc. 1952, 74, 1724-26. - An improved preparation of sodium desoxyribonucleate.
- (147) KAY R.E., HARRIS D.C., ENTEMMAN C. - Arch. Biochem. Biophys. 1956, 63, 14-25. - Quantification of the ninhydrin color reaction as applied to paper chromatography.
- (148) KAYSER F., METZINGER J. - C.R. Soc. Biol. 1954, 148, 1460-63. - Sulfamidoresistance et teneur d'un microorganisme (*Escherichia coli*) en coenzyme A.
- (149) KECK K. - Arch. Biochem. Biophys. 1956, 63, 446-51. - An ultra-microtechnique for the determination of desoxypentose nucleic acid.
- (150) KELLNER W., MARTIN H. - Naturwissensch. 1954, 41, 164. - Papierchromatographische Untersuchungen an *E.coli* aus verschiedes Nahrsubstrats.
- (151) KIRBY W.M.M. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1943, 53, 109-11. - In vitro action of urea sulfonamide mixtures.
- (152) KIRBY K.S. - Biochem. Biophys. Acta. 1955, 18, 575-76. - Some new solvent systems for the paper chromatography of nucleic acid degradation products.
- (153) KLOTZ I.M., MELCHIOR J.B. - Arch. Biochem. 1949, 21, 35-39. - Some aspects of the action of sulfonamides binding of S³⁵ labelled sulfanilamide by *Escherichia coli*.
- (154) KOENIG V.L., LARKINGS L., PERRINGS J.B. - Arch. Biochem. 1952, 30, 355-69. - Studies on the nucleoproteins and nucleic acids from Pneumo type VI.
- (155) KOHMAN T.P. - Anal. Chem. 1949, 21, 352-64. - Measurement techniques of applied radiochemistry.
- (156) KOHN H.I., HARRIS J.S. - J. Exp. Pharm. Therap. 1941, 73, 343-61. - On the mode of action of the sulfonamides. I. Action on *Escherichia coli*.
- (157) KORNBERG H.L., PATEY W.E. - Biochem. Biophys. Acta. 1957, 25, 189-93. - Quantitative determination of 0,5 - 5 µg of amino acids nitrogen on paper chromatograms and solution.
- (158) KOSSIAKOFF M.G. - Ann. Inst. Past. 1887. 1, 465. - De la propriété que possèdent les microbes de s'accomoder aux milieux antiseptiques.
- (159) LACASSAGNE A., NGUYEN PHI BUU HOI, ZAJDELA F., NGUYEN DAT XUONG - C.R. Acad. Sci. 1950, 231, 89-92. - Mise en évidence autoradiographique de l'absorption par des Bactéries de la sulfamidopyrine.

- (160) LALAND S.G., OVEREND W.G., WEBB M. - J. Chem. Soc. 1952, 3224-31. - Desoxypentose nucleic acids. The properties and composition of the desoxypentose nucleic acids from certain animal, plant and bacterial sources.
- (161) LAMBIN S., BERNARD J. - Ann. Pharm. Françaises. 1955, 13, 172-85. - Introduction à l'étude des modalités d'action des substances anti-septiques.
- (162) LAMPEN J.O., JONES M.J. - J. Biol. Chem. 1947, 170, 133-46. - The growth promoting and antisulfonamide activity of p. amino-benzoic acid, pteroylglutamic acid and related compounds for *Lactobacillus arabinosus* and *Streptobacterium plantarum*.
- (163) LANDUA A.J., AWAPARA J. - Science. 1949, 109, 385. - Use of modified ninhydrin reagent in quantitative determination of amino acids by paper chromatography.
- (164) LANDY M., LARKUM N.W., OSWALD E.J., STREIGHTOFF F. - Science. 1943, 97, 265-67. - Increased synthesis of p.aminobenzoic acid associated with the development of sulfonamide resistance in *Staphylococcus aureus*.
- (165) LARK C., LARK K.G. - J. Bact. 1958, 76, 666-67. - Nucleic acid synthesis in penicillin treated *Alcaligenes faecalis*.
- (166) LARSON F.C., MAAS A.R., ROBINSON C.V., CORDON E.S. - Anal. Chem. 1949, 21, 1206-7. - Self absorption of S³⁵ radiation in barium sulfate.
- (167) LECOQC E., LINZ R. - Ann. Inst. Past. 1953, 85, 383-86. - Un cas de résistance simultanée à la streptomycine et au bichlorure de mercure chez un *Staphylocoque*.
- (168) LEDERBERG J., LEDERBERG E.M. - J. Bact. 1952, 63, 399-406. - Replica plating and indirect selection of bacterial mutants.
- (169) LEDERER M., LEDERER E. - Chromatography. Elsevier publ. Co. Amsterdam. 1953.
- (170) LEMBERG R., CALLAGHAN J.P., TANDY D.E., GOLDSWORTHY N.E. - Austral. J. Exper. Biol. Med. Sci. 1948, 26, 9-27. - Production of aminobenzoic acids by bacteria resistant to sulphonamides.
- (171) LE MOAN G. - Thèse Pharm. (Etat) 1958, Paris. - Contribution à l'étude des phénomènes d'accoutumance aux substances médicamenteuses et toxiques : Recherches sur le comportement biologique de diverses souches de coli-bacilles rendues résistantes à la streptomycine et sur les hypothèses émises en vue d'expliquer cette résistance.
- (172) LESKOWITZ S., FOX C.L., RAYMOND S. - J. Exptl. Med. 1952, 95, 247-50. - The isolation and identification of para-aminobenzoic acid produced by *Staphylococci* resistant to sulfonamide.
- (173) LINZ R., LECOCQ E. - C.R. Soc. Biol. 1951, 145, 143-46. - Evolution des mélanges de bactéries sensibles et résistantes à la streptomycine (phénomènes de Welsch).
- (174) LODGE R.M., HINSHELWOOD C.N. - J. Chem. Soc. 1943, 208-215. - Growth of *Bac.lactis aerogenes* in media containing ammonium sulfate or various amino acids.
- (175) LURIA S.E., DELBRUCK M. - Genetics 1943, 28, 491-502. - Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance.
- (176) LYNN R.L., SMITH P.F. - J. Bact. 1957, 74, 811-17. - Nucleic acid content of pleuropneumonia-like organisms from human sources.
- (177) LYSYL I., ZAREMBO J.E. - Anal. Chem. 1958, 30, 428-30. - Rapid quantitative determination of sulfur in organic compounds.
- (178) MAASS E.A., JOHNSON M.J. - J. Bact. 1949, 57, 415-22. - Penicillin uptake by bacterial cells.
- (179) MAASS E.A., JOHNSON M.J. - J. Bact. 1949, 58, 361-66. - The relation between bound penicillin and growth in *Staphylococcus aureus*.

- (180) MACHEBOEUF M., DELSAL J. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1943, 25, 116-120. - Sur le dosage de très petites quantités de phosphore dans les matières organiques.
- (181) MACHLIN L.J., PEARSON P.B., DENTON C.A., BIRD H.R. - J. Biol. Chem. 1953, 205, 213-19. - The utilization of sulfate sulfur by the laying hen and its incorporation into cystine.
- (182) Mc INTOSH J., SELBIE F.R. - Brit. J. Exptl. Path. 1943, 24, 246-52. - Production of drug resistant cultures of bacteria in vitro and study of their inter-relationships.
- (183) Mc LEOD C.M., KRAUSS M.R. - J. Exper. Med. 1947, 86, 439-53. - Stepwise intratype transformation of pneumococcus from R to S by way of a variant intermediate in capsular polysaccharide production.
- (184) MAGANASIK B., VISCHER E., DONIGER R., ELSON D., CHARGAFF E. - J. Biol. Chem. 1950, 186, 37. - The separation and estimation of ribonucleotides in minute quantities.
- (185) MANDEL P., SENSENBRENNER M. - Biochem. Biophys. Acta. 1958, 29, 642-43. - Etude comparée de l'acide ribonucléique du bacillus Proteus et des formes L fixées qui en dérivent.
- (186) MANDELSTAM J. - Biochem. J. 1958, 69, 103-10. - The free amino-acids in growing and non-growing populations of Escherichia coli.
- (187) MARCHAL J.G. - Bull. Ass. Dipl. Microbiol. Fac. Pharmacie. Nancy. 1931, 1, 5-12. - Culture pure en bactériologie.
- (188) MARCHAL J.G. - Bull. Ass. Dipl. Microbiol. Fac. Pharmacie. Nancy. 1932, 4, 23-38. - La variabilité en microbiologie. Son existence et ses modalités.
- (189) MARCHAL J.G., DUPAIX-LASSEUR A., SCHWARTZ E. - Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharmacie. Nancy. 1946-47, 15, 42-50. - Facteurs favorisant le développement de plastides isolées par unité de B.roseus fluorescens.
- (190) MARCHAL J.G., KERGARAVAT A., PEPIN J. - Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharmacie. Nancy. 1946-47, 15, 51-59. - Allélocatalyse et développement bactérien.
- (191) MARCHAL J.G., DUPAIX-LASSEUR A., ANDRE P. - Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharmacie. Nancy. 1948-49, 16, 41-60. - Quelques observations concernant l'action de la pénicilline à l'échelle de l'unité bactérienne.
- (192) MARCHAL J.G., MITTWER T. - C.R. Soc. Biol. 1951, 145, 417-21. - Modifications apportées à la technique de chromatographie sur papier. Chromatographie en arc de cercle.
- (193) MARCHAL J.G., GRANDJEAN-RADOWITCH C. - Ann. Biol. Clin. 1957, 15, 373-78. - Métabolisme de l'acide l-aspartique par B.roseus fluorescens.
- (194) MARCO A.M., BUTLER G.C. - J. Biol. Chem. 1951, 190, 165-76. - The isolation of sodium desoxyribonucleate with sodium dodecyl sulfate.
- (195) MARKHAM R., SMITH J.D. - Biochem. J. 1951, 49, 401-6. - Chromatographic studies of nucleic acids. IV. The nucleic acid of the turnip yellow mosaic virus including a note on the nucleic acid of the tomato bushy stunt virus.
- (196) MARSHAK A. - J. Biol. Chem. 1951, 189, 607-15. - Purine et pyrimidine content of the nucleic acids of nuclei and cytoplasm.
- (197) MARSHAK A., VOGEL H.J. - J. Biol. Chem. 1951, 189, 597-605. - Microdetermination of purines and pyrimidines in biological materials.
- (198) MARTIN E.M., MORTON R.K. - Biochem. J. 1956, 64, 221-35. - The chemical composition of microsomes and mitochondria from silver beet.
- (199) MARUYAMA Y. - J. Bact. 1956, 72, 821-26. - Biochemical aspects of the cell growth of Escherichia coli as studied by the method of synchronous culture.

- (200) MATSUMOTO M. - J. Antibiotics. 1952, 5, 282. - Cité par Schnitzer et Grunberg dans "Drug resistance of microorganisms". Academic Press 1957, New-York.
- (201) MEJBAUM W. - Z. Physiol. Chem. 1939, 258, 117-20. - Über die Bestimmung kleine Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsäure.
- (202) MELCHIOR J.B., KLOTZ I.M. - Arch. Biochem. 1949, 21, 40.50. - Some aspects of the action of sulfonamides : rate controlling processes in growth studies with *E.coli*.
- (203) MELCHIOR J.B., GOLDKAMP A.H. - Anal. Chem. 1954, 26, 233-35. - Quantitative determination of S³⁵ labelled compounds in complex mixtures.
- (204) METAIS P. - Thèse. Sci. Nat. Strasbourg. 1956. - Etude des acides nucléiques du sang et de la moelle osseuse hématopoïétique.
- (205) METZINGER J. - Thèse Pharmacie. Nancy. 1954. - Etudes sur les sulfamides et sur la sulfamidorésistance.
- (206) MILLER C.P., BOHNOFF M. - Ann. Rev. Microbiol. 1950, 4, 217. - Development of bacterial resistance to antibiotics.
- (207) MIRICK G.S. - J. Clin. Invest. 1942, 21, 628. - Enzymatic identification of p-aminobenzoic acid in cultures of pneumococcus and its relation to the sulfonamidesfastness.
- (208) MIRSKY A.E., POLLISTER A.W. - J. Gen. Physiol. 1947, 30, 117-49. - Chromosin, a desoxyribose nucleoprotein complex of the cell nucleus.
- (209) MITCHELL P., MOYLE J. - Nature. 1950, 166, 218-20. - Occurence of a phosphoric ester in certain bacteria : its relation to gram staining and penicillin sensitivity.
- (210) MIURA Y., NAKAMURA Y., MATSUDAIRA H. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 1577-83. - Le mode d'action de l'acide usnique contre les bactéries.
- (211) MIURA Y., NAKAMURA Y. - C.R. Acad. Sci. 1951, 232, 1874-76. - Action du cobalt sur la ribonucléase.
- (212) MONOD J. - Actualités Scientifiques et Industrielles ; N° 911, 1942, L.Hermann. Paris. - Recherches sur la croissance des cultures bactériennes.
- (213) MORSE M.L., CARTER C.E. - J. Bact. 1949, 58, 317-25. - The synthesis of nucleic acid in culture of *E.coli*, strains B and B/R.
- (214) MOSS F.J., LEMBERG R. - Austr. J. Biol. Med. 1950, 667-77. - The production of p-aminobenzoic acid by *Staphylococcus aureus*, made resistant to sulphonamides.
- (215) MOULE Y. - Arch. Sci. Physiol. 1953, 7, 161-88. - Etude des acides nucléiques et de certains dérivés organiques et inorganiques du phosphore dans les tissus animaux.
- (216) NARURKAR M.V., SAHASRABUDHE M.B. - Biochem. Biophys. Acta. 1957, 23, 367-71. - Comparaison de the merits of the new method for hydrolysis of nucleic acid by phosphorus pentoxyde with those of the standard perchloric acid method.
- (217) NEIDHARDT F., GROS F. - Biochem. Biophys. Acta. 1957, 25, 513-20. - Metabolic instability of the ribonucleic acid synthetised by *E.coli* in the presence of chloramphenicol.
- (218) NEIPP L. - Thèse. Sci. Nat. Paris. 1937. - De l'influence de divers cations sur le croît microbien.
- (219) NERMUT M.V., DRASIL V. - Nature. 1958, 181, 1740-42. - Changes in the dry weight and the deoxyribonucleic acid content of *Proteus vulgaris* caused by penicillin.

- (220) NERVIK W.E., STEVENSON P.C. - Nucleonics. 1952, 10, 18-22. - Self scattering and self absorption of betas by moderately thick samples.
- (221) NEWCOMBE M.B., HAWIRKO R. - J. Bact. 1949, 57, 565-71. - Spontaneous mutation to streptomycin-resistance and dependance in *E.coli*.
- (222) NOLL H., BANG J., SORKIN E., ERLÉNMEYER H. - Helv. Chim. Acta. 1951, 37, 340-53. - Über die Wirkung eines mit S³⁵ indizierten Sulfathiazols auf Kulturen von *E.coli*.
- (223) NOVICK A., SZILLARD L. - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 1950, 36, 708-19. - Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria.
- (224) OAKBERG E., LURIA S. - Genetics. 1947, 32, 249-60. - Mutations to sulfonamide resistance in *Staphylococcus aureus*.
- (225) OGUR M., ROSEN G. - Arch. Biochem. 1950, 25, 262-76. - The nucleic acids of plant tissues : Extraction and estimation of desoxy-pentose nucleic acid and pentose nucleic acid.
- (226) PARDEE A.B., PRESTIDGE L.S. - J. Bact. 1956, 71, 677-83. - The dependance of nucleic acids synthesis on the presence of amino acids in *Escherichia coli*.
- (227) PARDEE A.B., PAIGEN K., PRESTIDGE L.S. - Biochem. Biophys. Acta. 1957, 23, 162-75. - Ribonucleic acid of normal and chloromycetin-inhibited bacteria by zone electrophoresis.
- (228) PARTRIDGE S.M. - Biochem. J. 1948, 42, 238-48. - Filter-paper partition chromatography of sugars. I. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and foetal blood of sheep.
- (229) PERCHKINE G.N., CHTCHERBAKOVA L.I. - Farmacol. i. Toksikol. 1955, 18, 49-56. - Absorption of sulfa drugs by bacterial cells.
- (230) PEREY M., MANDEL P., JACOB M., MANDEL U. - C.R. Acad. Sci. 1953, 237, 580-82. - Sur l'incorporation du 32 P dans les acides nucléiques.
- (231) PETRICK F.G. - J. Bact. 1946, 51, 539-45. - Atypical acid fast micro-organism. ADN. content.
- (232) PHAM GIA H. - Thèse Pharmacie. Paris. 1947. - Contribution à l'étude numérique et pondérale de la multiplication microbienne. Etude des variations morphologiques des germes au cours de la culture.
- (233) PIERFITTE M. - Bull. Soc. Pharmacie. Nancy. 1957, n° 34, 38-42. - Teneur en acides nucléiques de *Escherichia coli* sulfamidorésistant.
- (234) PIERFITTE M. - C.R. Soc. Biol. 1959, 153, 147-50. - Comparaison d'une souche de *Escherichia coli* sulfamido-sensible et d'une souche sulfamido-résistante : composition des protéines en acides aminés.
- (235) POLLOCK M.R., PERRET C.J. - Brit. J. Exptl. Path. 1951, 32, 387-95. - The relation between fixation of penicillin sulphur and penicillinase adaptation in *B.cereus*.
- (236) POLSON A. - Nature. 1948, 161, 351-52. - New aminoacids in bacterial hydrolysates.
- (237) POPENENKOVA Z.A. - Zhv. Mikrobiol. Epidemiol. i. Immunobiol. S.S.S.R., 1955, 12, 67-73. - Le taux des acides nucléiques dans le colibacille et sa modification sous l'action de la grisémine (Bull. Signal. 1956. 124 342).
- (238) POUCHOL J. - Thèse Pharmacie. Nancy. 1950. - Etude de l'association d'un sulfamide et d'un phénol sur la croissance d'une bactérie (*E.coli*).
- (239) POUTEAU-THOUVENOT M. - Thèse Pharmacie. Nancy. 1951. - Action de la sulfanilamide et de l'association sulfamido-phénol sur quelques processus métaboliques d'*Escherichia coli*.
- (240) PROOM J., WOIWOD A.J. - J. Gen. Microbiol. 1949, 3, 319-27. - The examination, by partition paper chromatography, of the nitrogen metabolism of bacteria.

- (241) PRUSOFF W.H., TEPLY L., KING C.G. - J. Biol. Chem. 1948, 176, 1309-17. - The influence of pteroylglutamic acid on nucleic acid synthesis in lactobacillus casei.
- (242) REGE D.V., SREENIVASAN A. - Nature. 1950, 166, 1117-18. - Folic acid, vitamin B 12 and nucleic acid synthesis in lactobacillus casei.
- (243) REIF W. - Beitr. Klin. Tuberk. Dtsch. 1957, 117, 169-71. - Aminosäurezusammensetzung der Proteine verschiedener Arten der Gattung Mycobacterium. Vergleich isoniazidsensibler und resistenter Stämme.
- (244) REUSSER F., SPENCER J.F.T., SALLANS H.R. - Can. J. Microbiol. 1957, 3, 721-28. - Essential aminoacids in microorganisms.
- (245) ROBERTS R.B., ABELSON P.H., COWIE D.B., BOLTON E.T., BRITTEN R.J. - Studies of biosynthesis in Escherichia coli. - Carnegie Inst. Washington. Publ. 607. 1955.
- (246) ROBERTS R.S. - Nature. 1950, 165, 494-95. - Influence of aeration on rate of growth in cultures.
- (247) ROBINOW C.F. - Proc. Roy. Soc. B. 1942, 130, 299-324. - A study of the nuclear apparatus of bacteria.
- (248) ROLAND J.F., GROSS A.M. - Anal. Chem. 1954, 26, 502-4. - Quantitative determination of aminoacids using monodimensional paper chromatography.
- (249) ROLAND F., STUART C.A. - Antibiotics and Chemotherapy 1951, 1, 523-29. - Directed mutation toward streptomycin resistance in Salmonella typhi.
- (250) ROSE M.M., FOX C.L. - Science. 1942, 95, 412-13. - A quantitative analysis of sulfonamide bacteriostasis.
- (251) ROWLEY D., MILLER J., ROWLAND S., LESTER SMITH E. - Nature. 1948, 161, 1009-10. - Studies with radioactive penicillin.
- (252) ROWLEY D., COOPER P.D., ROBERTS P.W., LESTER SMITH E. - Biochem. J. 1950, 46, 157-61. - The site of action of penicillin.
- (253) SAN G.L., ULTEE A.J. - Nature. 1952, 169, 586. - Paper chromatography of sulphonamides.
- (254) SARTORY A., MEYER J., BURI K. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1947, 29, 168-69. - Contribution à l'étude du métabolisme azoté des colibacilles. L'azote de la récolte bactérienne.
- (255) SARTORY A., MEYER J., BURI K. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1947, 29, 171-77. - Contribution à l'étude du métabolisme azoté des colibacilles. Mesure de la multiplication des colibacilles par néphélométrie et numération microscopique.
- (256) SCHAEFFER P. - Ann. Inst. Past. 1956, 91, 192-211. - Transformation interspécifique chez les bactéries du genre Hemophilus.
- (257) SCHMIDT G., THANNHAUSER S.J. - J. Biol. Chem. 1945, 161, 83-89. - A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues.
- (258) SCHNEIDER W.C. - J. Biol. Chem. 1945, 161, 293-303. - Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid.
- (259) SCHNITZER R.J., GRUNBERG E. - Drug Resistance of microorganisms Academic Press. 1957, New-York.
- (260) SCHOPFER W.H. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1948, 30, 748-57. - Sulfamides, acides nucléiques et purines.
- (261) SCHULMAN M.P., SONNE J.C., BUCHANAN J.M. - J. Biol. Chem. 1952, 196, 499-512. - Biosynthesis of purines I - Hypoxanthine formation in pigeon liver homogenates and extracts.
- (262) SCHWEITZER G.K., NEHLS J.W. - J. Phys. Chem. 1952, 56, 541-44. - Variables in the self absorption of low-energy beta particles
- (263) SCHWEITZER G.K., ELDRIDGE J.S. - Anal. Chim. Acta. 1957, 16, 189-93. - Reproducibility of radioactive sample preparation techniques.

- (264) SDOBNIKOVA O.V. - Trudy Komissii Anal. Khim. Akad. Nauk. S.S.S.R. 1955, 6, 522-26. - Chromatographic separation on paper and quantitative determination of amino acids. (in Chem. Abs. 50 - 13153 f).
- (265) SEIBERT F.B. - J. Biol. Chem. 1940, 133, 593-604. - Removal of the impurities, nucleic acid and polysaccharide from tuberculin protein.
- (266) SESLER C.L., SCHMIDT L.H. - J. Bact. 1942, 43, 73-74. - The activity of various sulfonamides against pneumococci made resistant to one of the drugs.
- (267) SEVAG M.G. - Biochem. Z. 1934, 273, 419-29. - Eine neue physikalische Entweissungsmethode zur Darstellung biologisch wirksamer Substanzen.
- (268) SEVAG M.G., LACKMAN D.B., SMOLENS J. - J. Biol. Chem. 1948, 124, 425-36. - The isolation of the components of streptococcal nucleoproteins in serologically active form.
- (269) SEVAG M.G., GREEN M.N. - J. Bact. 1944, 48, 623-30. - Mechanism of resistance to sulfonamides ; absence of correlation between resistance and formation of arylamine by *Staphylococcus aureus*.
- (270) SEVAG M.G., GREEN M.N. - J. Bact. 1944, 48, 615-22. - Mechanism of resistance to sulfonamides ; factors controlling formation of arylamine from tryptophane by *Staphylococcus aureus*.
- (271) SEVAG M.G., STEERS E. - Arch. Biochem. 1949, 24, 144-56. - The mechanism of resistance to sulfonamides : a quantitative study of the alternate metabolic pathway involving tryptophane and glucose metabolism, and aerobic and anaerobic growth conditions in relation to the mechanism of resistance.
- (272) SEVAG M.G., STEWART R.C. - Arch. Biochem. Biophys. 1952, 41, 14-20. - 4-amino 5-imidazole carboxamide. The relation of its metabolism to citric acid cycle.
- (273) SEVAG M.G., ISHII K. - Proc. Roy. Soc. B. 1958, 149, 63-81. - Drug induced reversible and irreversible enzyme alterations underlying drug resistance.
- (274) SHIVE W., ROBERTS E.C. - J. Biol. Chem. 1946, 162, 463-71. - Biochemical transformations as determined by competitive analogue-metabolite growth inhibition. II - Some transformations involving p-aminobenzoic acid.
- (275) SHIVE W. - Ann. Rev. Microbiol. 1952, 6, 437-66. - Biological activities of metabolite analogues.
- (276) SMITH J.D., MARKHAM R. - Biochem. J. 1950, 46, 509-13. - Chromatographic studies on nucleic acids.
- (277) SMITH J.D., WYATT G.R. - Biochem. J. 1951, 49, 144-48. - The composition of some microbial deoxypentose nucleic acids.
- (278) SPINK W.W., VIVINO J.J. - Science. 1943, 98, 44-45. - Pigment production by sulfonamide resistant *Staphylococci* in the presence of sulfonamides.
- (279) STETTEN M.R., FOX C.L. - J. Biol. Chem. 1945, 161, 333-49. - An amine formed by bacteria during sulfonamide bacteriostasis.
- (280) STOKES J.L. - J. Bact. 1944, 48, 201-9. - Substitution of thymine for "folic acid" in the nutrition of lactic acid bacteria.
- (281) STOKES J.L., GUNNESS M. - J. Bact. 1946, 52, 195-207. - The amino-acids composition of microorganisms.
- (282) STUMPF P.K. - J. Biol. Chem. 1947, 169, 367-71. - A colorimetric method for the determination of DNA.
- (283) SUE M.P. - Bull. Soc. Chim. Fr. 1951, 18, 9-32. - Analyses par les radioéléments artificiels et par les neutrons.
- (284) SZYBALSKI W., BRYSON V. - J. Bact. 1952, 64, 489-99. - Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I - Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics.

- (285) SZYBALSKI W., BRYSON V. - J. Bact. 1953, 66, 468-69. - One step resistance development to isoniazid and sodium p-aminosalicylate.
- (286) TABONNE J., NITTI F., SENEGAL M., MOUSSET H. - Ann. Inst. Past. 1943, 69, 253-56. - Etudes sur le pouvoir antisulfamide. VII - Comportement des protéines et de leurs produits d'hydrolyse enzymatique vis à vis du sulfamide.
- (287) TAMM C., HODES M.E., CHARGAFF E. - J. Biol. Chem. 1952, 195, 49-63. - The formation of apurinic acid from the desoxyribonucleic acid of calf thymus.
- (288) TAYLOR H.E. - J. Exper. Med. 1949, 89, 399-424. - Additive effects of certain transforming agents from some variants of Pneumococcus.
- (289) THOMPSON R.H.S., DUBOS R.J. - J. Biol. Chem. 1938, 125, 65-74. - The isolation of nucleic acid and nucleoprotein fractions from Pneumococci.
- (290) TOENNIES G., GALLANT D.L. - J. Biol. Chem. 1948, 174, 451-63. Bacterimetric studies. I - Factors affecting the precision of bacterial growth responses and their measurement.
- (291) TUBIANA M. - Les isotopes radioactifs en médecine et en biologie. 1950. Masson.
- (292) TULASNE R., WURTZ B. - C.R. Soc. Phys. Biol. 1944, 72. - Essais de culture de colibacilles sur milieu synthétique.
- (293) TULASNE R., VENDRELY R. - C.R. Soc. Biol. 1947, 141, 674-76. - Mise en évidence des noyaux bactériens par la ribonucléase.
- (294) VAAMONDE R., REGUEIRO B. - Microbiologica Espanola. 1958, 11, 77-90. - Estudio sobre el metabolismo de los acidos nucleicos de las bacterias.
- (295) VENDRELY R. - Un Symposium sur les protéines. 1946, 1. Masson. Paris. - Les deux acides nucléiques bactériens et leur signification. p.165-75.
- (296) VENDRELY R. - Experientia, 1947, 3, 196-98. - La libération des deux acides nucléiques au cours de l'autolyse des bactéries.
- (297) VENDRELY R. - The nucleic acids. 1955, 2, 155-81. - Academic Press. New-York. - The DNA content of the nucleus.
- (298) VENDRELY R., PALMADE C., VENDRELY C. - Nature. 1956, 178, 1044-46. - A new method for the extraction of desoxyribonucleic acid from bacteria.
- (299) VENDRELY R. - Exposés actuels de biologie cellulaire. 1958, L. Masson. Paris. - Les acides nucléiques et les nucléoprotéines des bactéries p.205-34.
- (300) VEN HORST H., JUKOVICH V., CARSTENS Y. - Anal. Chem. 1957, 29, 788-90. - Quantitative aspects of microchromatography.
- (301) VIRTANEN A.I., DE LEY J. - Arch. Biochem. 1948, 16, 169-76. - The enzyme activity and nitrogen content of bacterial cells.
- (302) VISCHER E., CHARGAFF E. - J. Biol. Chem. 1947, 168, 781-2. - The separation and characterization of purines in minute amounts of nucleic acid hydrolysates.
- (303) VISCHER E., CHARGAFF E. - J. Biol. Chem. 1948, 176, 703-14. - The separation and quantitative estimation of purines and pyrimidines minute amounts.
- (304) VISCHER E., CHARGAFF E. - J. Biol. Chem. 1948, 176, 715-35. - The composition of the pentose nucleic acids of yeast and pancreas.
- (305) VOLKIN E., COHN W.E. - Methods of biochemical analysis. 1955, vol.I, Interscience, New-York. Estimation of nucleic acids. p.287-300.
- (306) WACKER A., TREBST A., SIMON H. - Z. Naturforschg. 1957, 12, 315-19. - Über den Stoffwechsel des Sulfanilamids 35S bei empfindlichen und resistenten Bakterien.

- (307) WADE H.E., MORGAN D.M. - Biochem. J. 1957, 65, 321-31. - Nature of the fluctuating ribonucleic acid in *Escherichia coli*.
- (308) WAGNER P.T., POLLACK L.R., DONAHOE C.G. - Anal. Chem. 1957, 29, 405-8. - Estimating total absolute activity of small radioactive precipitates on filter paper.
- (309) WALKENSTEIN S.S., KNEBEL C.M. - Anal. Chem. 1957, 29, 1516-17. - Method for routine determination of sulfur ³⁵ in biological material.
- (310) WEBB J.M., LEVY H.B. - J. Biol. Chem. 1955, 213, 107-17. - A sensitive method for the determination of deoxyribonucleic acid in tissues and microorganisms.
- (311) WEBB M., NICKERSON W.J. - J. Bact. 1956, 71, 140-48. - Differential reversal of inhibitory effects of folic acid analogues on growth division and deoxyribonucleic acid synthesis of microorganisms.
- (312) WILLIAMS W.J., BUCHANAN J.M. - J. Biol. Chem. 1953, 202, 253-62. - Biosynthesis of purines. The metabolism of 4-amino 5-imidazole carboxamide in Yeast.
- (313) WINKLER K.C., DE HAAN P.C. - Arch. Biochem. 1948, 18, 97-107. - On the action of sulfonamides. XII. A set of non competitive sulfanilamide antagonists for *Escherichia coli*.
- (315) WOIWOD A.J. - J. Gen. Microbiol. 1949, 3, 312-18. - A technique for examining large numbers of bacterial cultures filtrates by partition chromatography.
- (316) WOLFE M. - Biochem. Biophys. Acta. 1957, 23, 186-91. - The quantitative determination of aminoacids by paper chromatography.
- (317) WOODS D.D., FILDES P. - Chem. et Indust. 1940, 59, 133-34. - The anti-sulphanilamide activity (in vitro) of p.aminobenzoic acid and related compounds.
- (318) WOODS D.D. - Croissance microbienne et facteurs d'inhibition 1952, OMS, Genève. - Vitamin B group substances, especially folic acid and B 12 in the metabolism of microorganisms.
- (319) WOODS D.D. - Brit. Med. Bull. 1953, 9, 122-25. - Folic acid and related compounds in the metabolism of microorganisms.
- (320) WOOLLEY D.W. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1948, 30, 805-16. - Some structural analogs antagonistic to pteroylglutamic acid (acid folic).
- (321) WOOLLEY D.W., PRINGLE R.B. - J. Am. Chem. Soc. 1950, 72, 634-35. - Formation of 4-amino 5-imidazole carboxamide during growth of *Escherichia coli* in the presence of 4-amino pteroylglutamic acid.
- (322) WORK E. - Biochem. Biophys. Acta. 1949, 3, 400-11. - Chromatographic investigations of aminoacids from microorganisms : the amino acids of *C. diphteriae*.
- (323) WORK T.S. - The basis of chemotherapy. 1948, Clarendon Press. Oxford.
- (324) WYATT G.R. - Biochem. J. 1951, 48, 584-90. - The purine and pyrimidine composition of deoxypentose nucleic acids.
- (325) WYSS O. - Ann. N.Y. Acad. Sci. 1950, 53, 183-90. - Bacterial resistance.
- (326) YEGIAN D., BUDD V., MIDDLEBROOCK G. - J. Bact. 1946, 51, 479-87. - Biological changes in sulfonamide-resistant *Mycobacterium ranae*.
- (327) YI YONG LEE, WAHL R., BARBU E. - Ann. Inst. Past. 1956, 91, 212-24. - Contenu en bases puriques et pyrimidiques des acides désoxyribonucléiques des bactéries.
- (328) YOUNG A.S. - J. Bact. 1948, 55, 503-14. - The relationship of the delay in sulfonamide bacteriostasis.
- (329) YOUNG L., EDSON M., Mc CARTER J.A. - Biochem. J. 1949, 44, 179-85. - The measurement of radioactive sulfur in biological material.

- (330) ZALOKAR R.M. - Proc. Natl. Acad. Sci. US. 1948, 33, 32-36. - The p-aminobenzoic acid requirement of the "sulphonamide-requiring" mutant strain of *Neurospora crassa*.
- (331) ZAMENHOFF S., BRAWERAN G., CHARGAFF E. - Biochem. Biophys. Acta. 1952, 9, 402-5. - On the desoxypentose nucleic acids from several microorganisms.
- (332) ZAMENHOFF S., LEIDY G., ALEXANDER H.E., FITZGERALD P.L., CHARGAFF E. - Arch. Biochem. Biophys. 1952, 40, 50-55. - Purification of the desoxypentose nucleic acid of *Hemophilus influenzae* having transforming activity.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
AVANT-PROPOS.....	5
INTRODUCTION - DEVELOPPEMENT DE LA RESISTANCE AUX DROGUES CHEZ LES MICROORGANISMES.....	8
I - Obtention des souches résistantes.....	8
II - Théories proposées pour expliquer l'apparition de la résis- tance aux drogues.....	9
III - Mise en évidence de propriétés nouvelles qui pourraient rendre compte de la résistance des microorganismes.....	10
1/ Modification de la perméabilité à l'agent toxique.....	10
2/ Destruction enzymatique ou modification de la drogue.	11
3/ Elaboration d'une voie métabolique secondaire.....	11
4/ Production accrue de métabolites capables de neutra- liser la drogue.....	11
MODE D'ACTION DES SULFAMIDES ET SULFAMIDORESISTANCE.	11
<u>CHAPITRE I</u> - GENERALITES : SOUCHE UTILISEE, TECHNIQUES DE CULTURE, MESURE DE LA CROISSANCE.....	16
I - Microorganisme utilisé dans nos recherches.....	16
II - Milieu de culture employé.....	16
III - Méthodes de culture.....	17
A - Cultures non aérées.....	17
B - Cultures aérées.....	17
a) par agitation mécanique.....	17
b) par passage d'un courant d'air.....	18
IV - Mesure de la croissance.....	18
A - Mesure de la densité optique.....	18
B - Détermination du poids sec bactérien.....	20
C - Dosage de l'azote total bactérien.....	21
<u>CHAPITRE II</u> - OBTENTION DE SOUCHES DE E.COLI RESISTANTES A LA SULFANILAMIDE. - MAINTIEN DE LA RESIS- TANCE ACQUISE.....	23
<u>CHAPITRE III</u> - ETUDE DE LA CROISSANCE DE E.COLI SULFA- MIDOSENSIBLE ET SULFAMIDORESISTANT.....	29
I - Etude de la croissance de E.coli N.....	30
II - Etude du début de la croissance de E.coli SA 5 en milieu sulfamidé à 5 g/l.....	41

	Pages
III - Etude du début de la croissance de E.coli SA 10 en milieu sulfamidé à 10 g/l.....	44
IV - Comparaison de la croissance des trois souches en milieu non sulfamidé.....	46
V - Etude du début de la croissance de E.coli N en milieu sulfamidé.....	47
VI - Etude de l'influence de l'aération sur la croissance des trois souches d'E.coli.....	50
 <u>CHAPITRE IV</u> - ETUDE DE LA PENETRATION DE LA SULFANILAMIDE DANS LA CELLULE DE E.COLI SENSIBLE ET RESISTANT.....	 53
I - Matériel et techniques utilisés.....	57
II - Etude de la fixation de la sulfanilamide par E.coli.....	60
A - Fixation de sulfanilamide par E.coli en "resting cells".	60
B - Etude de la fixation de sulfanilamide par E.coli durant sa croissance.....	63
C - Etude de la répartition de la sulfanilamide fixée par E.coli.....	66
 <u>CHAPITRE V</u> - RECHERCHE COMPARATIVE DE MODIFICATIONS APPARUES DANS LE MILIEU DE CULTURE DURANT LA CROISSANCE DE E.COLI SENSIBLE ET SULFAMIDORESISTANT.....	 69
I - Etude des variations de l'acidité du milieu de culture....	69
A - Etude des variations du pH.....	69
B - Etude des variations de l'acidité titrable à la phénolphtaléine.....	70
II - Etude de la consommation de glucose durant la croissance.	72
III - Comparaison de certains besoins nutritifs de E.coli sensible et résistant à la sulfanilamide : soufre et azote.....	76
A - Etude des effets de la carence en soufre.....	76
B - Etude comparative de l'utilisation de différentes sources de soufre.....	78
C - Etude des besoins en azote.....	81
IV - Recherche d'antisulfamides dans les milieux de culture de E.coli.....	82
 <u>CHAPITRE VI</u> - RECHERCHE DE MODIFICATIONS APPARUES CHEZ E.COLI SULFAMIDORESISTANT.....	 87
I - Etude des acides aminés des protéines de E.coli sensible et résistant à la sulfanilamide.....	87
Techniques utilisées.....	88
Résultats.....	90
II - Etude des acides nucléiques chez E.coli sensible et résistant à la sulfanilamide.....	91
A - Etude quantitative des acides nucléiques.....	92
I - Technique de dosage des acides nucléiques.....	92
II - Résultats.....	96
1/ Données bibliographiques.....	96
2/ Travaux personnels.....	98
a) Etude quantitative des acides nucléiques en fin de croissance logarithmique.....	98

	Pages
b) Etude quantitative des acides nucléiques durant la croissance.....	103
c) Etude quantitative des acides nucléiques chez E.coli SA 5 et SA 10, cultivés en présence ou non de sulfanilamide.....	111
B - Etude comparative des bases constituant les acides nucléiques.....	113
1/ Techniques d'étude des bases constituant les acides nucléiques.....	113
2/ Résultats.....	115
C - Essais d'induction de résistance à la sulfanilamide de E.coli sensible à l'aide d'acide désoxyribonucléiques extrait d'une souche de E.coli résistant.....	119
RESUME ET CONCLUSIONS.....	122
BIBLIOGRAPHIE.....	126

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

MODE D'ACTION DES SULFAMIDES HYPOGLYCEMIANTS.

Vu et approuvé
Nancy, le 9 Octobre 1959
Le Doyen de la Faculté
F. KAYSER

Vu,
Nancy, le 9 Octobre 1959
Le Président de thèse
F. KAYSER

Vu et permis d'imprimer
Nancy, le 10 Octobre 1959
Le Recteur de l'Académie
Président du Conseil de l'Université
G. MAYER

IMP. LOUIS-JEAN — GAP

Dépôt légal n° 68 — 1961

